

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**“Aislamiento y caracterización de enterovirus en
enfermedad tipo influenza en niños menores de
15 años, Piura 2011”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

José Luis Alfredo Huamán Torres

ASESOR

Víctor Crispín Pérez

Lima – Perú

2015

INDICE GENERAL	pag.
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	
1.1 Situación Problemática	1
1.2 Formulación del problema	
1.2.1 Problema general	1
1.2.2 Problemas específicos	1
1.3 Justificación del problema	1-2
1.4 Objetivos	
1.4.1 Objetivo general	2
1.4.2 Objetivos específicos	2
CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO	
2.1 Antecedentes de investigación	3-6
2.2 Género Enterovirus	
2.2.1 Generalidades	6-8
2.2.2 Genoma	8-9
2.2.3 Cápside viral	9-10
2.2.4 Clasificación	10-12
2.3 Diagnóstico de Enterovirus	
2.3.1 Aislamiento de cultivo celular	12-14
2.3.2 Identificación y caracterización	14-15
2.4 Epidemiología de Enterovirus	
2.4.1 Transmisión	15-16
2.4.2 Infección	17-18
2.5 Antecedentes en Sudamérica	18-20

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Flujograma de trabajo	21
3.2 Tipo de estudio	22
3.3 Población	22
3.4 Definición de caso	22
3.5 Muestra	22
3.6 Aislamiento e identificación viral	
3.6.1 Cultivo celular e inmunofluorescencia	23-24
3.6.2 Extracción de ARN	24
3.6.3 Amplificación de la región 5'UTR	24-25
3.6.4 Amplificación de la región VP1	25-27
3.6.5 Secuenciamiento	27
3.6.6 Análisis filogenéticos	27
3.6.7 Análisis estadístico	28

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados	
4.1.1 Datos epidemiológicos de la población estudiada	29
4.1.2 Aislamiento de enterovirus	29
4.1.3 Tipificación de enterovirus	29-32
4.1.4 Prevalencia de enterovirus en Piura 2011	32
4.1.5 Comparación de aislamientos en líneas celulares	33-35
4.2 Discusión	
4.2.1 Enterovirus en Perú	36-38
4.2.2 Comparación de líneas celulares	38-40

CONCLUSIONES	41
---------------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42-47
-----------------------------------	-------

LISTAS DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de especies de enterovirus

Tabla 2: Susceptibilidad de líneas celulares para el aislamiento de EV

Tabla 3: Antecedentes de EV asociados a infección respiratoria en Sudamérica

Tabla 4: Primers utilizados para la identificación de EV

Tabla 5: Primers utilizados para la tipificación de EV

Tabla 6: Distribución de serotipos por especie y grupo de edad

Tabla 7: Serotipos aislados por línea celular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del genoma de enterovirus, mostrando sus diferentes regiones y sitios de clivaje

Figura 2: Estructura de la cápside de los enterovirus

Figura 3a: Árbol filogenético de EV especies EVA y EVC

Figura 3b: Árbol filogenético de EV especies EVB

Figura 4: Monocapa de células RD sin infectar

Figura 5: Células RD con efecto citopático por enterovirus

Figura 6: Monocapa de células A549 sin infectar

Figura 7: Células A549 con efecto citopático por enterovirus

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

CV: coxsackievirus

E: echovirus

E-MEM: Médio Mínimo Esencial de Eagle

ETI: Enfermedad tipo influenza

EV: Enterovirus

ICTV: Comité Internacional para la taxonomía de virus

IFA: Inmunofluorescencia

IRA: Infección respiratoria aguda

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PV: poliovirus

RHV: rinovirus

RT: transcripción reversa

SFB: suero fetal bovino

RESUMEN

Los enterovirus (EV) son la causa más común de infecciones de las vías respiratorias en humanos y se clasifican en siete especies (EV A-D y rinovirus [RVF] A-C) con más de 200 serotipos diferentes. Poco se sabe acerca del rol de EV en las infecciones respiratorias en América del Sur. El objetivo principal de este estudio fue determinar la prevalencia de los EV en niños ≤ 15 años con enfermedad tipo influenza incluidos en un estudio de vigilancia pasiva de Influenza y otros virus respiratorios en el distrito de Piura durante el año 2011. Se obtuvo de cada participante una muestra de hisopado faríngeo y datos epidemiológicos. El aislamiento viral se realizó mediante cultivo celular utilizando cuatro líneas celulares (LLCMK2, Vero E6, RD y A549). La identificación y determinación del serotipo de EV se realizaron mediante el ensayo de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales. Los aislamientos no serotificables por inmunofluorescencia, fueron seleccionados para su análisis mediante RT-PCR, seguido por secuenciamiento. En total se analizaron 424 muestras, aislándose EV en 47 muestras (11,1%). 46.8% de estos EV se encontraron en niños ≤ 1 año de edad. Nuestros resultados revelaron un predominio de especies EVB (62,5%). No se aislaron especies EVD. Se identificaron quince serotipos, 4 EVA, 8 EVB, y 2 EVC. Por otra parte, siete muestras no pudieron ser correctamente clasificadas con nuestra metodología. Los serotipos más frecuentes fueron coxsackievirus B2, coxsackievirus A2, y echovirus 9. El uso de células RD y A549 incrementó el aislamiento de EV. Este estudio proporciona datos sobre los serotipos de EV que circulan en el distrito de Piura y establece la necesidad de realizar más estudios.

Palabras clave: Enterovirus, infecciones respiratorias, Piura

ABSTRACT

Enteroviruses (EVs) are the most common cause of respiratory tract infections in humans and are classified into seven species (EVA-D and rhinovirus [RV] A-C) with more than 200 different serotypes. Little is known about the role of EVs in respiratory infections in South America. The main objective of this study was to determine the prevalence of EVs in children aged ≤ 15 years with influenza-like illness enrolled in an Influenza and other respiratory viruses' passive surveillance network in the district of Piura during 2011. Throat swabs and epidemiological data were collected from each participant. Virus isolation was performed by cell culture using four cell lines (LLCMK2, Vero, RD and A549). The identification and serotyping of EV were performed by immunofluorescence assay using monoclonal antibodies. Isolates non-serotypeable by immunofluorescence were selected for analysis by RT-PCR, followed by sequencing. A total of 424 samples were analyzed, and EVs were found in 47 samples (11.1%). 46.8% of these EVs were found in children aged ≤ 1 year. Our results revealed a predominance of EVB species, 62.5%. No EVD isolates were isolated. Fifteen serotypes were identified, 4 EVA, 8 EVB, and 2 EVC species. Moreover, seven samples could not be correctly classified with our methodology. The most common serotypes were coxsackievirus B2, coxsackievirus A2, and echovirus 9. The use of cells RD and A549 increase the isolation of EVs. This study provides data about the serotypes of EVs circulating in the district of Piura and sets the need for further studies.

Keywords: Enterovirus, respiratory infections, Piura

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

En el Perú las infecciones respiratorias constituyen un importante problema de salud pública especialmente en población infantil, siendo según el Ministerio de Salud la principal causa de mortalidad durante el año 2011 con el 12.1%. El Ministerio de Salud y el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales - NAMRU-6 realizan estudios de vigilancia del virus Influenza, sin embargo, la información de otras etiologías virales es escasa.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

- ¿Cómo determinar la prevalencia de enterovirus en menores de 15 años con enfermedad tipo influenza en el distrito de Piura en 2011?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cómo determinar los serotipos de enterovirus aislados en el distrito de Piura en 2011?
- ¿Cómo determinar la mejor línea celular para el aislamiento de enterovirus?
- ¿Cómo determinar el grupo etario con mayor índice de aislamiento de enterovirus en el distrito de Piura en 2011?

1.3 Justificación de la investigación

Diversos estudios han demostrado la importancia de los enterovirus en infecciones respiratorias tanto en niños como en adultos. Además existen reportes del aislamiento de estos patógenos en casos de enfermedad tipo influenza tanto en niños como adultos (Jacques et al., 2008; Koon et al., 2010; Lo et al., 2010; Monto, 2002; Portes et al., 1998; Stralioetto et al., 2002; Trallero et al., 2010). Sin embargo actualmente la información disponible sobre la epidemiología de enterovirus relacionada a infecciones respiratorias en Sudamérica es muy escasa. Estos estudios en su gran mayoría reportan datos globales de detección de enterovirus sin mencionar los serotipos

involucrados (Arango et al., 2015; Douce et al., 2011; Laguna-Torres et al., 2009; Laguna-Torres et al., 2010).

Laguna-Torres *et al* en 2009 reportaron que la mayoría de los casos positivos a virus respiratorios se presentaron en niños menores de 15 años, además, Piura presentó el 50.8% de sus casos positivos a algún virus respiratorio. En este estudio también se reporta una prevalencia global de 0.5% para enterovirus. Sin embargo estos resultados están subestimados por el uso de líneas celulares con poca susceptibilidad para enterovirus (Laguna-Torres et al., 2009).

La metodología expuesta en el presente estudio podrá ser utilizada en trabajos similares en otras ciudades, y así conocer la verdadera magnitud de enterovirus en infecciones respiratorias en Perú.

Con los resultados de este estudio se podrá conocer el rol de enterovirus en las infecciones respiratorias en niños de Piura. Comparando los resultados obtenidos con los reportados en otras partes del mundo se podrá evidenciar el potencial riesgo de nuestra población a presentar otro tipo de infecciones. Los resultados obtenidos servirán como punto de partida y de referencia para futuros estudios sobre enterovirus en infecciones respiratorias así como en otro tipo de enfermedades como por ejemplo, infecciones del sistema nervioso.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Determinar la prevalencia de enterovirus en niños menores de 15 años con enfermedad tipo influenza en el distrito de Piura en 2011.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar los serotipos de enterovirus aislados en el estudio.
- Identificar la mejor línea celular para el aislamiento de enterovirus.
- Determinar el grupo etario con mayor índice de aislamiento de enterovirus en el distrito de Piura en 2011.

CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de investigación

La enfermedad tipo influenza (ETI) se presenta como una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, especialmente en niños quienes presentan en promedio de dos a siete episodios al año (Monto, 2002). Esta enfermedad presenta una amplia variedad de síntomas, pudiendo ser asintomático en hasta 50% de las personas infectadas o bien evolucionar gravemente ocasionando la muerte. Se caracteriza por cefalea, congestión nasal, dolor de garganta, fiebre mayor o igual a 38°C, malestar general, mialgias y pérdida de apetito. La Guía Técnica del 2009 de la Organización Panamericana de la Salud define un caso de ETI como: paciente de cualquier edad con historia de aparición súbita de fiebre superior a 38°C y tos o dolor de garganta.

Aunque la incidencia de ETI es similar tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, los índices de mortalidad son más altos en estos últimos. En regiones de clima templado del hemisferio norte como Estados Unidos y Europa los agentes etiológicos asociados a ETI están bien caracterizados, Sin embargo, en Sudamérica, la información disponible sobre la epidemiología y etiología de ETI es escasa; incrementándose en los últimos años.

Aproximadamente el 80% de los patógenos identificados en casos de infecciones respiratorias se atribuyen a virus respiratorios. ETI se puede atribuir a un amplio espectro de estos patógenos, incluyendo los virus influenza, adenovirus, virus sincitial respiratorio, enterovirus, metapneumovirus humano y los virus parainfluenza. Las manifestaciones clínicas de las infecciones respiratorias causadas por diferentes agentes virales puede ser muy parecidas, dificultando el diagnóstico etiológico (Arango et al., 2015; Laguna-Torres et al., 2009; Monto, 2002).

Los enterovirus (EV) se clasifican dentro de la familia Picornaviridae, género *Enterovirus*. Estos virus son pequeños, no envueltos y poseen un

genoma ARN de aproximadamente 7,400 nucleótidos dispuestos en una hebra simple, sentido positivo. EV presenta características especiales tales como su estabilidad a pH ácidos, éter, cloroformo, alcohol y su poca sensibilidad a detergentes no iónicos; que constituye un problema para el control de estos virus (Minor PD & Muir P, 2009; Modlin J, 2010; Romero JR, 2007).

Los EV que afectan humanos se subdividen en cuatro especies, EVA – EVD, de acuerdo a sus características genotípicas y antigénicas. Además, este grupo incluye más de 100 diferentes serotipos y su número se incrementa con nuevos serotipos que son continuamente descubiertos (Knowles N.J et al., 2012). Los EV se transmiten principalmente de persona a persona por vía fecal-oral u oral-oral y por contacto con descargas de garganta, gotas respiratorias o fómites (Romero JR, 2007).

Aunque muchas de estas infecciones son asintomáticas, también pueden causar un amplio rango de síndromes clínicos, tales como infecciones respiratorias, meningitis, encefalitis, conjuntivitis, parálisis flácida y la enfermedad mano-boca-pie. El número de infecciones por EV varía según clima, región, edad y situación socioeconómica. Además, 75 % de las infecciones por estos virus ocurren en niños menores a 15 años de edad (Minor PD & Muir P, 2009; Modlin J, 2010; Romero JR, 2007).

La técnica “Gold standard” para el diagnóstico de la mayoría de EV es el cultivo celular, a pesar del incremento en el uso y la variedad de métodos moleculares (Romero JR, 2007). Sin embargo, por su diversidad, no se ha encontrado una única línea celular en la cual la replicación de todos los serotipos sea exitosa; por este motivo se requiere el uso de varias líneas celulares para la óptima recuperación de los diferentes serotipos.

Los estudios realizados son escasos y no existe un consenso con respecto a que combinación de células es más eficiente; sin embargo algunas propuestas han sido publicadas (Jacques et al., 2008; Mizuta et al., 2008; She, Crist, Billetdeaux, Langer, & Petti, 2006; Terletskaia-Ladwig et al.,

2008). La Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de células RD y L20B para la detección de enterovirus polio y no-polio. Las células de riñón de mono muestran mayor susceptibilidad para poliovirus, coxsackievirus B y echovirus; las células RD para poliovirus, coxsackievirus A y echovirus; y la línea celular A549 para poliovirus, coxsackievirus B y echovirus (Terletskaia-Ladwig et al., 2008). La combinación de líneas celulares que se utilizará en este estudio es la siguiente: células de riñón de mono (LLCMK2 y Vero E6) y las células humanas (RD y A549). Cabe resaltar que las dos primeras células se utilizan en las investigaciones que realiza el Departamento de Virología e Infecciones Emergentes para el aislamiento de virus respiratorio en sus diferentes protocolos.

Diversos estudios han demostrado la importancia de los EV en infecciones respiratorias tanto en niños como en adultos (Jacques et al., 2008; Koon et al., 2010; Lo et al., 2010; Portes et al., 1998; Trallero et al., 2010). Además se ha reportado el aislamiento de estos patógenos en estudios de vigilancia de enfermedad tipo influenza (ETI) e infección respiratoria aguda (IRA) en los últimos años (Arango et al., 2015; Garcia et al., 2013; Huaman et al., 2014; Laguna-Torres et al., 2009; Laguna-Torres et al., 2010). Durante la pandemia de influenza A (H1N1) del 2009; Koon *et al* reportaron que coxsackievirus and echovirus fueron los patógenos virales más comunes en las muestras negativas a pH1N1 (Koon et al., 2010). Aunque los serotipos de EV pueden co-circular, diferencias en el serotipo predominante se observa según la región. Por ejemplo, los serotipos predominantes en pacientes con infecciones respiratorias por EV en Francia (Jacques et al., 2008) y España (Trallero et al., 2010) fueron echovirus 11 y echovirus 6; en Taiwán (Lo et al., 2010) y China (Xiang et al., 2012), coxsackievirus B3 y coxsackievirus A21; y en Brasil (Portes et al., 1998), echovirus 11, respectivamente.

Sin embargo, actualmente la información disponible sobre la epidemiología de EV relacionada a infecciones respiratorias en Sudamérica es muy escasa, y se encuentra limitada a unos cuantos estudios de vigilancia de ETI o IRA (Arango et al., 2015; Douce et al., 2011; Huaman et

al., 2014; Laguna-Torres et al., 2009; Laguna-Torres et al., 2010). Estos estudios en su gran mayoría reportan datos globales de detección de EV sin mencionar los serotipos involucrados en cada caso.

La vigilancia epidemiológica nos da información crucial para entender los cambios que se presentan en la circulación de los diferentes serotipos de EV y su asociación con las enfermedades. La identificación del serotipo es esencial para propósitos epidemiológicos, estableciendo el serotipo dominante cada año así como la detección de nuevos serotipos.

2.2 Género Enterovirus

2.2.1 Generalidades

Antiguamente los enterovirus (EV) y los rinovirus (RHV) se consideraban como dos géneros diferentes, sin embargo en el noveno reporte del Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) estos dos grupos son considerados como parte de un mismo género, *Enterovirus* (Knowles N.J et al., 2012). De este punto en adelante se denominara EV a todos los miembros del género con excepción de los rinovirus.

El género *Enterovirus* es uno de los 12 géneros que conforman la familia Picornaviridae (“*Pico*”-pequeño, “*rna*”-referencia al genoma, “*viridae*”-referencia a virus). De manera similar a otros miembros de la misma familia, los EV son pequeños (~30nm de diámetro en su estado hidratado), sin envoltura, con partícula viral esférica y poseen un genoma ARN hebra simple de cadena positiva (Knowles N.J et al., 2012; Romero JR, 2007).

Sus propiedades físicas, tales como su densidad de flotación en cloruro de cesio y su estabilidad a medios ácidos permiten distinguir a los EV de otros picornavirus. Muchos aspectos de su patología, transmisión y epidemiología están íntimamente relacionados con sus propiedades biofísicas y su ciclo de vida citolítico (Modlin J, 2010; Romero JR, 2007).

Los viriones de la mayoría de EV son estables en un amplio rango de pH (3 a 10) lo que les permite mantenerse infectivos durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal. Además los EV son resistentes a muchos desinfectantes usados en laboratorio incluyendo alcohol 70%, isopropanol, lisol diluido y componentes de amonio cuaternario. Estos virus no muestran sensibilidad a solventes lipídicos incluyendo éter y cloroformo; y son estables en muchos detergentes a temperatura ambiente. Sin embargo, EV se inactiva con formaldehído, glutaraldehído, hipoclorito de sodio, cloro residual, temperaturas mayores a 56°C y luz ultravioleta (Knowles N.J et al., 2012; Romero JR, 2007).

Los EV son estables en ambientes líquidos y pueden sobrevivir por muchas semanas en agua, fluidos corporales y aguas residuales. Esto debido a algunas propiedades de los viriones que incluyen termoestabilidad en la presencia de cationes divalentes, estabilidad a ácidos y la ausencia de una envoltura lipídica (Minor PD & Muir P, 2009; Romero JR, 2007).

La replicación del virus se da principalmente en el tracto gastrointestinal y/o en el tracto respiratorio alto, pero en algunos casos esta replicación se puede dar en otros tejidos como nervios y músculo originando un amplio espectro de enfermedades desde simples resfríos hasta encefalitis (Minor PD & Muir P, 2009; Modlin J, 2010; Romero JR, 2007).

La susceptibilidad de las células huésped a la infección por EV está definida por la presencia de proteínas de membrana específicas que funcionan como receptores a las cuales se une el virus. Por ejemplo, los tres serotipos de poliovirus comparten un mismo receptor "PVR", un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que es codificado por el cromosoma 19. La CD55 o DAF (por sus siglas en inglés, decay-accelerating factor) una proteína reguladora del complemento y la molécula intercelular de adhesión 1 (ICAM-1) juegan un rol importante en la entrada a la célula del coxsackievirus A21. Los coxsackievirus B también interactúan con 2 diferentes proteínas de membrana celular, el receptor coxsackievirus-adenovirus (CAR) de 49 kDa y DAF. El DAF aparece también como el

principal receptor para la mayoría de los echovirus, mientras que los serotipos 1 y 8 se unen a la subunidad α de la molécula de integrina VLA (Minor PD & Muir P, 2009; Modlin J, 2010).

2.2.2 Genoma

Los EV presentan un genoma de ARN de hebra simple de aproximadamente 7.4 kb que sirve como plantilla para la traducción de proteínas virales así como para la replicación del ARN. El genoma está organizado en 4 regiones: una región no codificante larga (~740 nucleótidos) denominada 5'UTR, seguido de un marco abierto de lectura denominado ORF (~6600 nucleótidos), luego una región no codificante corta (entre 70 y 100 nucleótidos) llamada 3'UTR y finalmente una cadena terminal poliadenilada (Figura1) (Minor PD & Muir P, 2009; Romero JR, 2007).

Dentro de la región 5'UTR se encuentra el sitio de entrada interna al ribosoma o IRES (por sus siglas en ingles) que permite la traducción directa de la poliproteína. Además, esta región se encuentra covalentemente unida a una proteína pequeña de aproximadamente 7kDa denominada VPg, la cual es necesaria para la iniciación de la síntesis de ARN. Se ha demostrado también que la región 3'UTR juega un rol importante en la replicación del ARN viral (Knowles N.J et al., 2012; Racaniello, 2007).

El ORF se inicia y finaliza aproximadamente en los nucleótidos 740 y 7370, respectivamente. El ARN completo funciona como un mensajero monocistrónico cuyo producto de traducción es una poliproteína de peso molecular 250 kDa. Esta poliproteína sufre cortes específicos para formar tres polipéptidos, P1, P2 y P3. La región P1 sufre clivajes sucesivos para formar la cápside viral, formándose 5 copias de VP1, VP3 y VP0 (precursor de VP2 y VP4) dentro de subunidades, con el subsiguiente ensamblaje de 12 de estos pentámeros dentro de una cápside dodecaédrica completa (Minor PD & Muir P, 2009; Romero JR, 2007).

La encapsulación del ARN viral está asociada con el clivaje final de la proteína VP0 en VP2 y VP4. Las regiones P2 y P3 codifican siete proteínas

no estructurales (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D) que son esenciales para el ciclo vital del virus con funciones conocidas que incluyen actividad polimerasa, clivaje proteolítico de los productos de traducción e inhibición de la síntesis de proteínas de las células huésped (Knowles N.J et al., 2012; Romero JR, 2007).

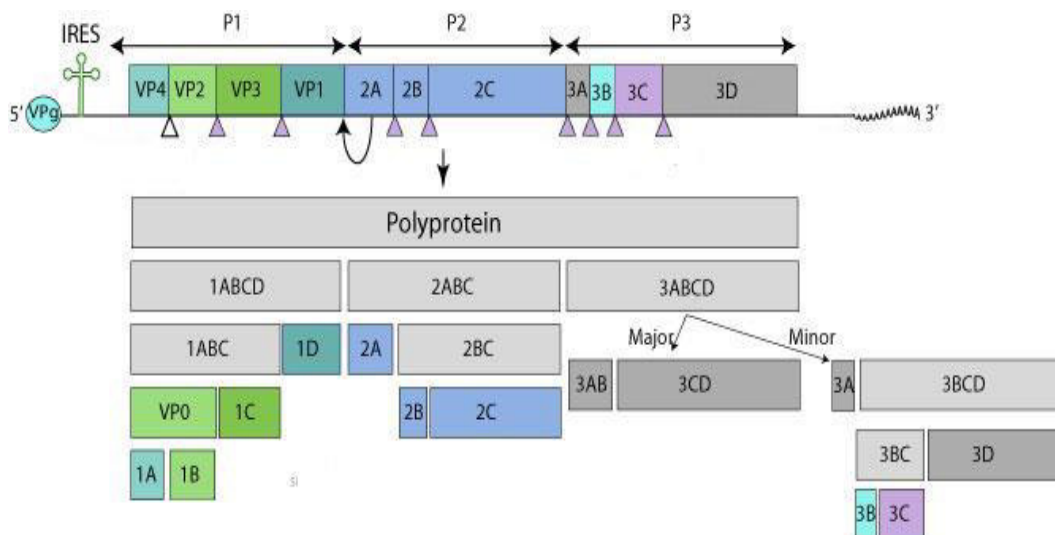


Figura1. Esquema del genoma de los enterovirus, mostrando sus diferentes regiones y sitios de clivaje (referencia: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html)

2.2.3 Cápside viral

Como la mayoría de los miembros de la familia Picornaviridae, la cápside de los EV está compuesta por 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales (VP1-VP4). Estas se encuentran organizadas en una estructura icosaédrica que presenta simetría rotacional 5:3:2. Cada una de estas 4 proteínas se asocian para formar una subunidad denominada protómero, en el que las 3 proteínas mayores (VP1-VP3) se disponen en la superficie del virión y el pequeño péptido VP4 lo hace en la cara interna; la asociación de 5 protómeros constituye un pentámero y la asociación de 12 pentámeros constituyen el icosaedro con un pseudo número de triangulación (T) igual a 3 (Figura2).

Las proteínas de la cápside cumplen varias funciones: i) Proteger al ARN genómico de las endonucleasas ambientales; ii) Reconocer los receptores celulares específicos, proceso fundamental en la determinación del rango de huésped y del tropismo celular; iii) Determinar la antigenicidad; iv) Portar las señales de desensamblaje para la liberación del ARN genómico y de empaquetamiento durante la maduración del virión (Racaniello, 2007).

La síntesis de ARN se produce después de 3 horas post-infección. Luego de 6 a 7 horas, los viriones son visibles dentro del citoplasma por microscopia electrónica, con su subsiguiente liberación por lisis de la célula resultando en una carga de 10^4 a 10^5 viriones por célula (Minor PD & Muir P, 2009; Romero JR, 2007).

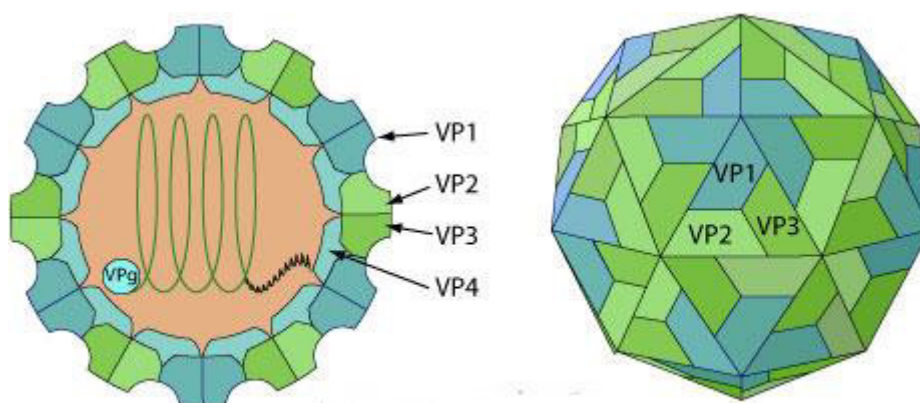


Figura2. Estructura de la cápside de los enterovirus. Se observa las proteínas VP1, VP2 y VP3 en la cara externa, mientras que la proteína VP4 en la cara interna (referencia:http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html)

2.2.4 Clasificación

Los EV humanos fueron originalmente clasificados en 4 grupos en base a los patrones de replicación que presentaban en cultivos celulares y sus manifestaciones clínicas en humanos y al ser inoculadas intracranalmente en ratones lactantes. Estos grupos son: i) poliovirus (PV) agentes causales de poliomielitis en humanos, generalmente no patógenos

en ratones; ii) coxsackievirus A (CVA) asociados a enfermedades del sistema nervioso central, exantemas en humanos, y causantes de parálisis flácida en ratones; iii) coxsackievirus B (CVB) asociados a enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades cardíacas en humanos, y causantes de parálisis aséptica en ratones; y iv) echovirus (E) de las cuales no se conocía enfermedades provocadas en humanos y no eran patógenos en ratones. Aunque estos criterios fueron útiles por un largo tiempo, la aparición de nuevos EV y el desarrollo de nuevas líneas celulares hacia cada vez más difícil la clasificación, es por esto que los nuevos serotipos fueron denominados como enterovirus y numerados consecutivamente a partir del EV68 (Knowles N.J et al., 2012; Minor PD & Muir P, 2009; Romero JR, 2007).

Algunos virus pertenecientes a este género principalmente echovirus (E) fueron clasificados en un principio de forma equivocada. Por ejemplo, E8 y E1 son el mismo serotipo, E10 es ahora reovirus 1, E28 es ahora rinovirus humano 1A, E22 es ahora parechovirus humano 1 y E23 es ahora parechovirus humano 2. De igual manera se ha determinado que CVA23 y E9, CVA15 y CVA11, CVA18 y CVA13 son el mismo serotipo. Hepatitis A virus 1 (HAV-1; género *Hepatovirus*) fue en un principio nombrado como enterovirus 72. Rinovirus humano 87 es considerado una variante de EVD68 (Romero JR, 2007).

En los últimos años los métodos de biología molecular han permitido realizar la clasificación de los EV de una manera más clara, principalmente mediante el análisis filogenético basado en las secuencias completas de la proteína viral VP1, la principal proteína de la cápside de los EV. El número de serotipos se ha incrementado año tras año por la identificación de nuevos EV en base a las características moleculares. Según el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV) este género se encuentra dividido en 12 especies (Tabla 1); se consideran como EV humanos las especies A, B, C y D. Los EV son clasificados dentro del mismo serotipo si presentan una similitud nucleotídica mayor al 75% y una similitud aminoacídica mayor al 85% del gen VP1 (Oberste et al., 1999; Romero JR, 2007). Estos virus

presentan diferencias en su afinidad a un tipo de célula, propiedades antigénicas y los receptores celulares. Sin embargo, en todos los casos el hábitat natural y el sitio primario de replicación es el tracto intestinal.

Tabla 1. Clasificación de especies de enterovirus

Nomenclatura actual	Nomenclatura anterior	# serotipos
<i>Enterovirus A</i>	<i>Human enterovirus A</i>	24
<i>Enterovirus B</i>	<i>Human enterovirus B</i>	61
<i>Enterovirus C</i>	<i>Human enterovirus C</i>	23
<i>Enterovirus D</i>	<i>Human enterovirus D</i>	5
<i>Enterovirus E</i>	<i>Bovine enterovirus (grupo A)</i>	4
<i>Enterovirus F</i>	<i>Bovine enterovirus (grupo B)</i>	6
<i>Enterovirus G</i>	<i>Porcine enterovirus B</i>	11
<i>Enterovirus H</i>	<i>Simian enterovirus A</i>	1
<i>Enterovirus J</i>	<i>unclassified simian viruses</i>	6
<i>Rhinovirus A</i>	<i>Human rhinovirus A</i>	80
<i>Rhinovirus B</i>	<i>Human rhinovirus B</i>	32
<i>Rhinovirus C</i>	<i>Human rhinovirus C</i>	53

Fuente: Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (Knowles N.J et al., 2012)

2.3 Diagnóstico de Enterovirus

2.3.1 Aislamiento en cultivo celular

Esta es la técnica utilizada en la mayoría de laboratorios clínicos. El efecto citopático que se presenta en la infección por EV es la reducción de tamaño y redondeo de las células dentro de la monocapa. Luego, el núcleo de las células infectadas presenta piknosis. Cuando la infección progresa la célula se degenera y se separa de la superficie de la placa. La detección del efecto citopático cuando la carga viral es baja, como suele suceder en muestras como líquido cefalorraquídeo, oscila entre 3,7 y 8,2 días. Para la confirmación de EV se realiza una inmunofluorescencia o neutralización con anticuerpos monoclonales genéricos para EV dirigido a la proteína viral VP1. También se pueden realizar pruebas físico-químicas, que demuestran la capacidad de este virus para crecer en presencia de cloroformo y pH ácido (Knowles N.J et al., 2012; Romero JR, 2007)

En la tabla 2, se resume la susceptibilidad de las líneas celulares comúnmente usadas en aislamiento viral. Se puede observar que no hay una sola línea celular óptima que soporte el crecimiento de todos los serotipos de EV. Por esta razón se recomienda el uso de varias líneas celulares para optimizar el aislamiento y diagnóstico de enterovirus.

Tabla 2. Susceptibilidad de líneas celulares para el aislamiento de EV (Romero JR, 2007)

Línea Celular	Susceptibilidad para el aislamiento de			
	Poliovirus	Coxsackievirus		Echovirus
		A	B	
Riñón de mono				
Rhesus	+++	+	+++	+++
Cynomolgus	++++	+	+++	+++
Bufalo verde (BGM)	+++	+	++++	++
Humanas				
HeLa	+++	+	+++	+
Riñón (HK)	+++	+	++	+++
WI-38	++	++	+	+++
Pulmón de embrión (HELFI)	+++	++	+	+++
MRC-5	+++	+	+	+++
Rabdomiosarcoma (RD)	+++	+++	+	+++
Hep-2	+++	+	+++	+
A549	+++	+	+++	+++
NCI-H292	+++	+++	+++	+++

La Organización Mundial de la Salud en su manual de laboratorio para poliovirus, recomienda el uso de las líneas celulares RD y L20B para el aislamiento de poliovirus y otros EV. Es ampliamente conocida la dificultad para aislar coxsackievirus A en cultivo celular, siendo la célula RD la más sensible para ello. En ocasiones, los laboratorios de diagnóstico clínico utilizan la combinación de una línea de riñón de mono, más otra de fibroblasto humano, a la que se le puede añadir la línea RD para recuperar con mayor facilidad y rápidamente echovirus y aquellos virus pertenecientes al grupo coxsackievirus A (Romero JR, 2007).

Otras líneas celulares han sido probadas con éxito en diferentes estudios para el aislamiento de enterovirus. Algunas líneas tumorales

humanas como CaCo-2, procedente de carcinoma de colon (Buck, Wiesemann, & Stewart, 2002), o NCI-H292, carcinoma mucoepidermoide de pulmón, han mostrado una alta sensibilidad para el aislamiento de enterovirus perteneciente a cualquier serotipo (Hierholzer, Castells, Banks, Bryan, & McEwen, 1993).

2.3.2 Identificación y caracterización

La principal técnica usada para identificar enterovirus a partir de cultivo celular es el uso de anticuerpos monoclonales para cada serotipo mediante la técnica de inmunofluorescencia y/o neutralización de suero. En la década de los 80, la identificación de los serotipos se realizaba basándose en la neutralización con un pool (grupo) de sueros equinos hiperinmunes y antisueros monovalentes policlonales para su confirmación. El test de diagnóstico ampliamente utilizado fue el de Lim Benyesh-Melnick (LBM) (Melnick, Rennick, Hampil, Schmidt, & Ho, 1973), en el que anticuerpos de 42 EV diferentes son mezclados en 8 grupos (A-H), el sobrenadante viral desconocido es incubado separadamente con cada pool a 37°C durante 2 horas, luego la mezcla virus-antisuero se inocula en otro sistema de cultivo celular susceptible durante varios días. El conjunto de antisueros que neutralizaban el aislado desconocido es el que identifica el virus. Esta técnica fue durante mucho tiempo el “Gold Standard”, pero es muy laboriosa, consume mucho tiempo y muchas cepas permanecen como no tipificables.

Actualmente, se emplean kits comerciales, el kit usado con mayor frecuencia para la identificación de EV es el desarrollado por “Diagnostic Hybrids”. Para la identificación de serotipos el kit desarrollado por “Millipore” permite identificar 18 serotipos (PV1-3, CVA9, CVA16, CVA24, CVB1-6, E4, E6, E9, E11, E30, ENT71). Sin embargo el gran número de serotipos existentes y el descubrimiento cada año de nuevos serotipos hace más laboriosa la identificación de EV. Por este motivo en los últimos años el uso de la biología molecular ha cobrado mayor notoriedad y es cada vez más usada para la identificación y el descubrimiento de nuevos serotipos.

En la región 5'UTR del genoma de EV se encuentran secuencias muy conservadas entre los distintos serotipos, lo cual lo hace un blanco perfecto para el diseño de *primers* y sondas utilizadas en el diagnóstico molecular. Los segmentos situados entre las posiciones 444-468, 542-560 y 577-596 (numeración relativa al genoma del poliovirus 1, cepa Mahoney), han sido estudiados como reactivas frente a la mayoría de serotipos de EV (Coiras, Aguilar, Garcia, Casas, & Perez-Brena, 2004; Oberste et al., 1999).

La biología molecular ha aportado mucho a la determinación del serotipo de EV, ya que existen cepas no neutralizables mediante los serotipos clásicos, por diferencias notables con su cepa prototipo, como sucede con CVA24v, causante de importantes brotes de conjuntivitis hemorrágica. Por ello se han probado distintas regiones del genoma de EV que sirvan para determinar el serotipo de una manera confiable. Estudios realizados reportan que las regiones VP2, VP4 o ARN polimerasa, son muy semejantes entre los distintos serotipos, por lo que no permiten una discriminación adecuada (Casas et al., 2001; Oberste, Maher, & Pallansch, 1998). Sin embargo, la secuencia de la región VP1 si aporta las condiciones idóneas, tal como se ha observado en distintos estudios, una explicación es que esta región es altamente inmunogénica (neutralizable de anticuerpos). Mediante el análisis de esta región se determina un aislamiento en un serotipo determinado si tiene una homología $\geq 75\%$ en nucleótidos y/o $\geq 85\%$ en aminoácidos con su cepa representativa (Oberste et al., 1999; Romero JR, 2007).

2.4 Epidemiología de Enterovirus

2.4.1 Transmisión

Las infecciones por estos virus son muy prevalentes y presentan una distribución mundial, variable según la estación climática, región, edad y situación socioeconómica. Las infecciones se dan a lo largo de todo el año, pero en zonas de clima templado, las mayores tasas se producen en la época más calurosa. En climas tropicales, las infecciones por EV ocurren todo el año con un incremento de la incidencia durante la temporada de lluvias. Este carácter estacional nunca se ha explicado satisfactoriamente,

pero las altas temperaturas podrían favorecer la presencia en las aguas de una mayor cantidad de EV en el medio ambiente. Es importante recordar, la gran cantidad de portadores asintomáticos, que transmiten la infección con la misma eficacia que los enfermos (Modlin J, 2010).

Existen varias vías de transmisión para estos virus como por ejemplo: fecal-oral, respiratoria, transplacentaria, perinatal, aunque la emisión más prolongada del virus es desde el tracto gastrointestinal y por ello, la ruta fecal-oral es la principal vía de transmisión. A pesar de eso, para ciertos serotipos como CVA21, enterovirus 68, 70 y 71; la ruta respiratoria y la inoculación directa son importantes para su transmisión (Modlin J, 2010; Romero JR, 2007).

Según la Organización Mundial de la Salud, tres cuartas partes del total de enfermedades causadas por EV se producen en niños menores de 15 años, probablemente por la ausencia de contacto anterior con los diferentes serotipos del virus. En un estudio llevado a cabo en Nueva York durante el pico anual de transmisión se observó una tasa de infección de los niños menores de un mes del 12.8%. Las tasas de Infección sintomática decrecen a partir del segundo mes de vida, aunque continúan siendo superiores en niños de corta edad que en niños mayores o adultos. Los niveles socioeconómicos más bajos también presentan altas tasas de infección, por el hacinamiento, la falta de higiene y la mayor facilidad de contaminación fecal (Modlin J, 2010).

La frecuencia con la que cada serotipo causa infección puede variar de manera significativa. Algunos serotipos muy prevalentes se aíslan todos los años mientras que otros pueden surgir o reaparecer tras muchos años de relativa inactividad. No se conocen bien las razones por las que aparecen y desaparecen los distintos serotipos, comportándose de forma endémica o epidémica (Modlin J, 2010; Romero JR, 2007).

2.4.2 Infección

Los EV pueden causar un amplio espectro de enfermedades en humanos. Además de producir infecciones gastrointestinales pueden afectar otros órganos: *Poliovirus* afecta el sistema nervioso central, produciendo parálisis flácida, el grupo de los *Coxsackievirus* está asociado a pancreatitis, miocarditis, encefalitis y diabetes mellitus, *Enterovirus 70* produce conjuntivitis hemorrágica aguda, mientras que los *Echovirus* y otros *Enterovirus* se asocian a meningitis y encefalitis, fundamentalmente en niños. Sin embargo, ninguna enfermedad es asociada únicamente a algunos serotipos específicos de EV y ningún serotipo es únicamente asociado a una sola enfermedad (Minor PD & Muir P, 2009; Modlin J, 2010; Romero JR, 2007).

Si bien la mayoría de las infecciones enterovirales suelen ser asintomáticas, la manifestación clínica más común de infección por EV es una enfermedad febril aguda no específica, con o sin presencia de exantema. Este síndrome viral es una de las mayores causas de fiebre en niños. Además, la meningitis, representa la infección del sistema nervioso central reportada con mayor frecuencia y su presentación clínica varía con la edad del paciente y con la capacidad de producir una respuesta inmune eficiente (Modlin J, 2010).

Estos virus son la principal causa de síndrome febril respiratorio sin foco o “gripe de verano” con disfagia y tos en ocasiones. La infección del tracto respiratorio alto causada por EV es por lo general clínicamente indistinguible de enfermedades causadas por otros agentes como por rinovirus o *Mycoplasma pneumonia*, al menos que estén acompañadas por meningitis aséptica, exantema u otras manifestaciones clínicas que evidencien infección por EV (Modlin J, 2010; Romero JR, 2007).

Muchos serotipos están asociados a infección del tracto respiratorio alto. Entre los serotipos mejor caracterizados están CVA21 y CVA24, los cuales producen una enfermedad similar al resfrío común, excepto por una alta incidencia de fiebre. Se ha reportado brotes epidémicos CVA21 en

población militar, aunque no existen reportes de epidemias en población civil si se reporta alta evidencia serológica. Echovirus 4, 8, 9, 11, 20, 22 y 25 son también causas de enfermedad respiratoria. Las infecciones por EV del tracto respiratorio bajo son poco comunes, sin embargo algunos serotipos como echovirus 6, 9, 11, 33 y enterovirus 71, han sido aislados en infantes y niños con neumonía. En los últimos años ha cobrado gran importancia el estudio de *enterovirus 68*, perteneciente a la especie EVD. Las infecciones de este serotipo suelen ser exclusivamente del tracto respiratorio y ha sido reportado en Asia, Europa y Estados Unidos (Modlin J, 2010; Xiang et al., 2012).

2.5 Antecedentes en Sudamérica

En Sudamérica se han realizado diversas investigaciones con respecto a la vigilancia ambiental de EV (Kluge et al., 2014; Spilki et al., 2013; Vecchia et al., 2012), así como algunas relacionadas a infecciones neurológicas en Argentina (Cisterna et al., 2007; Freire et al., 2003; Mistchenko, Viegas, Latta, & Barrero, 2006) y Brasil (Castro, Cruz, Silva, & Gomes Mde, 2005; Gomes Mde, de Castro, Oliveira, & da Silva, 2002). Sin embargo, son pocos los estudios que reportan EV asociado a infecciones respiratorias.

Estos reportes se encuentran incluidos en trabajos más amplios centrados en la investigación de la etiología de la enfermedad tipo influenza en países como Ecuador, Colombia, Brasil y Perú (Tabla 3). La mayoría de estos estudios usan el cultivo celular y la inmunofluorencia como técnicas de identificación y caracterización de EV.

Tabla 3. Antecedentes de EV asociado a infección respiratoria en Sudamérica

AUTOR	PAÍS	CARACTERÍSTICAS	METODOLOGÍA	RESULTADOS	SEROTIPOS
(Portes et al., 1998)	Brasil	Infección respiratoria aguda 93% niños secreción nasofaríngea 1985 - 1991	Cultivo celular Hep-2*, MRC-5*, RD* neutralización	Total: 2153 EV: 45 (2.1%)	PV 1 y 2 E1,2,7,11,19,31 CVB4
(Laguna-Torres et al., 2009)	Perú	ETI 0-94 años Hisopados orofaríngeos 2006 - 2008	Cultivo celular Vero* y LLCMK2* IFA	Total: 6,835 EV: 31 (0.5%)	No describe
(Laguna-Torres et al., 2010)	Perú	ETI 0-100 años Hisopados orofaríngeos enero - julio 2009	Cultivo celular Vero* y LLCMK2* IFA	Total: 2872 EV: 52 (1.8%)	No describe
(Douce et al., 2011)	Ecuador	ETI 0-100 años Hisopados orofaríngeos 2006 - 2010	Cultivo celular Vero* y LLCMK2* IFA	Total: 1,702 EV: 15 (0.88%)	No describe
(García et al., 2013)	Latinoamérica	ETI ≤ 25 años Hisopados nasofaríngeos 2010 - 2011	RT-PCR Secuenciamiento	Total: 3375 EV: 101 (3%)	PV, CVA CVB, E Ent68, 71, 99 Ent104, 109
(Arango et al., 2015)	Colombia	ETI 0 - 76 años Hisopados orofaríngeos 2007 - 2012	Cultivo celular Vero* y LLCMK2* IFA	Total: 2039 EV: 13 (0.64%)	No describe
(Huaman et al., 2014)	Perú	ETI 0-100 años Hisopados nasofaríngeos 2005-2010	Cultivo celular Vero* y LLCMK2* IFA RT-PCR, secuenciamiento	Total: 24239 EV: 175 (0.7%)	PV, CVA CVB, E Ent71

* Se usaron para aislamiento de Enterovirus, ETI: Enfermedad tipo Influenza

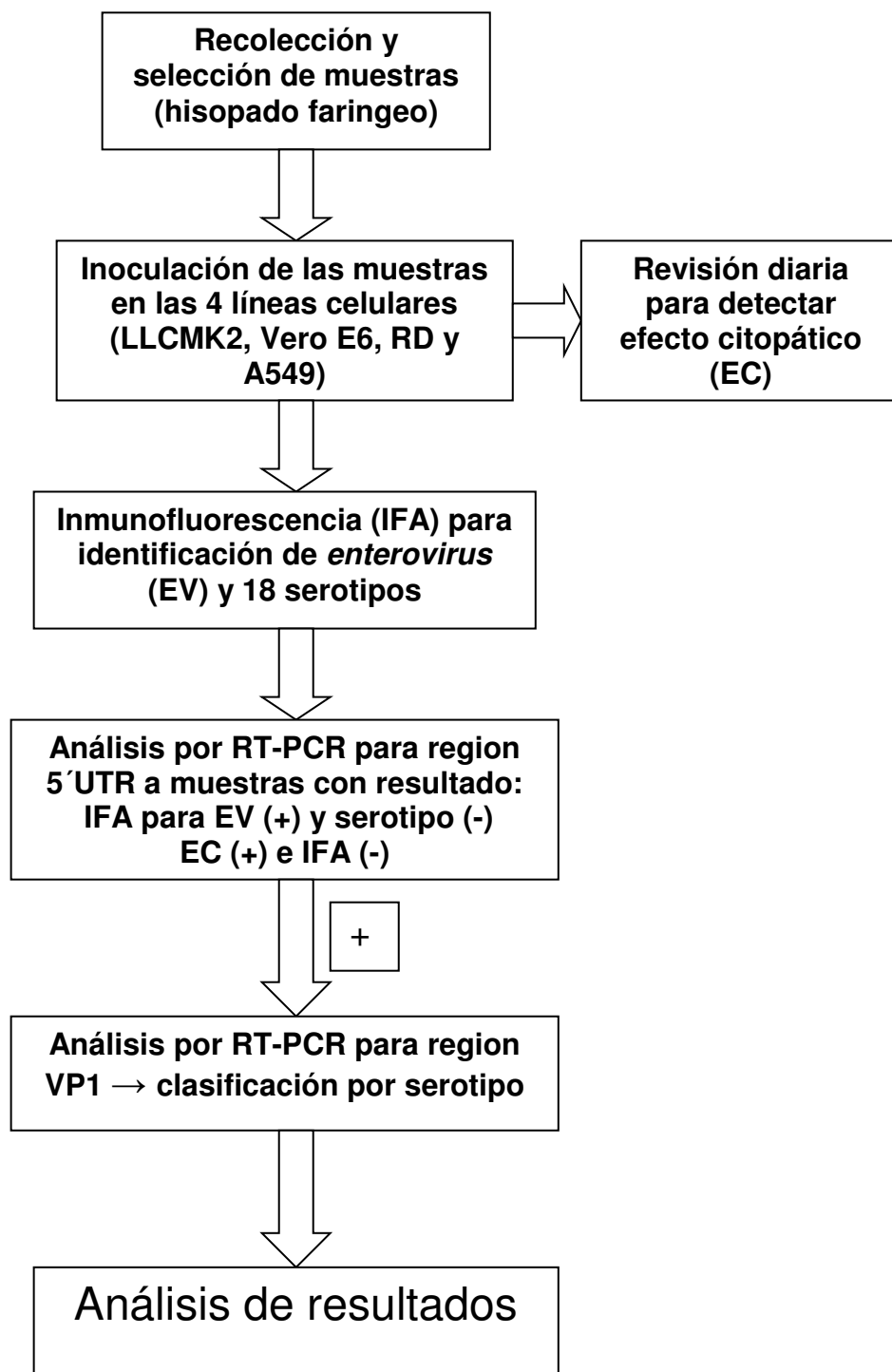
García *et al* realizaron un estudio para detectar rinovirus y enterovirus en pacientes con ETI en diferentes países de latinoamérica, empleando RT-PCR para su detección y secuenciamiento para su caracterización. Este estudio se muestra como uno de los primeros que muestra en detalle la distribución de serotipos de EV en latinoamérica, mostrando a los virus del grupo EVB como los más frecuentes en estas muestras (García et al., 2013).

En el campo de la epidemiología, en nuestro país solo existen tres estudios donde se reporta EV asociados a infecciones respiratorias, sin embargo solo uno de ellos investiga en detalle los serotipos aislados en estas muestras. Todos estos estudios se realizaron en el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (NAMRU-6), en el Departamento de Virología e Infecciones Emergentes. Los estudios realizados por Laguna-Torres *et al* en 2009 y 2010, reportan EV en muestras de pacientes con ETI entre 2006 – 2008 y 2009 con una frecuencia de 0.5% y 1.8%, respectivamente. Estos estudios se realizaron en 13 ciudades del Perú abarcando costa, sierra y selva (Laguna-Torres *et al.*, 2009; Laguna-Torres *et al.*, 2010).

En 2014, Huamán *et al* reportaron resultados obtenidos analizando muestras de pacientes con ETI obtenidas entre el año 2005 al 2010 y colectadas en 11 ciudades del Perú, este es el primer y único estudio hasta la fecha que reporta en detalle los serotipos de EV que circulan en el país. En este estudio se reporta una prevalencia de 0.7% además se aislaron 16 serotipos la mayoría pertenecientes al grupo EVB (Huaman *et al.*, 2014).

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Flujograma de trabajo



3.2 Tipo de estudio

El estudio realizado es un estudio observacional, descriptivo de serie de casos, transversal y retrospectivo. El trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Virología e Infecciones Emergentes del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (NAMRU-6) ubicado en el distrito de Bellavista – Callao. Este centro lleva a cabo protocolos de vigilancia epidemiológica de virus respiratorios en Perú y otros países de la región.

3.3 Población

Para realizar este estudio se incluyeron muestras de pacientes con Enfermedad Tipo Influenza (ETI), con edades ≤ 15 años, que fueron atendidos en el Centro de Salud de “Pachitea” ubicado en el distrito de Piura, provincia de Piura, departamento de Piura durante enero a diciembre del 2011. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética del NAMRU-6. Para el análisis de resultados las edades se separaron en cuatro grupos de edad (< 1 años, 1 - 5 años, 6-10 años, 11-15 años).

3.4 Definición de caso

En este estudio se utilizó la definición de ETI dada por la Organización Mundial de Salud. Definición de caso: cualquier persona con episodio de fiebre (temperatura oral $\geq 38^{\circ}\text{C}$, temperatura axilar $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$) y tos o dolor de garganta con menos de 5 días de duración al momento de la toma de muestra.

3.5 Muestra

De cada paciente incluido en el estudio se obtuvo una muestra de hisopado faríngeo. Esta muestra fue obtenida con un hisopo de nylon (Copan Diagnostics, EE.UU), colocada en un medio de transporte universal “UTM™” de 3 mL (Diagnostic Hybrids, EE.UU), luego almacenadas a -20°C y transportadas al laboratorio usando contenedores con hielo seco. En el laboratorio las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento (Laguna-Torres et al., 2009; Laguna-Torres et al., 2010).

3.6 Aislamiento e identificación viral

3.6.1 Cultivo celular e Inmunofluorescencia

Para el aislamiento de EV, las muestras se inocularon en diferentes líneas celulares tanto animales como humanas para permitir el crecimiento de los diversos serotipos así como cualquier otro agente viral implicado en el proceso infeccioso. Todas las muestras fueron inoculadas en monocapa de células en placas de 24 pozos. Se emplearon cuatro líneas celulares obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC®): Células de riñón de mono verde africano (Vero E6; CRL-1586TM), células de riñón de mono Rhesus (LLCMK2; CCL-7TM), células de Rhabdomyosarcoma - músculo (RD; CRL-136TM) y células de adenocarcinoma – pulmón (A549; CRL-185TM).

Para todas las líneas celulares se utilizó como medio de crecimiento 1 mL de Medio Mínimo Esencial de Eagle (E-MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una mezcla antibiótica. El medio de mantenimiento utilizado consistió en E-MEM, suplementado con 2% de SFB y antibióticos (10 mg estreptomicina y 25 µg amfotericina B por ml). Una vez formada la monocapa de células en cada pozo, aproximadamente después de 3 días de preparadas, 200µl de muestra se agregó en cada pozo de la placa, cada muestra se inoculó por duplicado en cada línea celular. Para ello, se eliminó el medio de crecimiento de cada pozo, se depositaba la muestra sobre la monocapa y se dejaba absorber mediante centrifugación a 600g x 30 minutos a 33°C. Posteriormente, las placas se incubaron por 1 hora a 37°C, para luego agregar a cada pozo 1ml de medio de mantenimiento. Las muestras procesadas, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por un lapso de 10 días. Las placas fueron visualizadas diariamente para la detección de efecto citopático característico. Por lo general, el efecto producido por EV se manifiesta después de 3 – 10 días post-infección (Laguna-Torres et al., 2009; Laguna-Torres et al., 2010; Huaman et al., 2014).

Después de este tiempo o una vez observado efecto citopático, se prepararon laminas para realizar el ensayo de inmunofluorescencia (IFA). Se

colectó 400 μ L de cultivo de cada pozo, se centrifugó a 2000 rpm x 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 300 μ L buffer fosfato salino (PBS) 1x. Este pellet en PBS se utilizó para preparar laminas las cuales se dejaron secar dentro de la cabina de flujo laminar y una vez secas se fijaron en acetona a -20°C x 1 hora. Se determinó la presencia de EV mediante el kit comercial “D3 Enterovirus Duo Pack” (Diagnostic Hybrids; EE.UU). Las muestras positivas en este paso fueron probadas con diferentes kit comerciales de anticuerpos monoclonales que identifican 18 serotipos de EV divididos en 5 grupos (Millipore; EE.UU). Además de EV, se realizó detección de otros virus por IFA como: adenovirus, influenza A virus, influenza B virus, parainfluenza virus 1-3, virus sincitial respiratorio, virus herpes simplex y metapneumovirus humano.

3.6.2 Extracción de ARN

Las muestras con efecto citopático y resultado negativo para EV, así como las muestras con resultado EV positivo pero sin tipificación por IFA fueron seleccionadas para su análisis y clasificación por métodos de biología molecular (RT-PCR). El ARN se obtuvo de 140 μ L cultivo celular usando el kit de extracción Viral RNA Mini Kit (QIAamp, Qiagen; EE.UU).

3.6.3 Amplificación de la región 5'UTR

Para determinar la presencia de EV, en las muestras seleccionadas, sometimos los ARN obtenidos a una reacción de RT-PCR anidada (nested RT-PCR), para la región que codifica 5'UTR, se utilizó los primers (Tabla 4) (Coiras et al., 2004).

La primera parte del proceso consistió en realizar una transcripción reversa (RT) para obtener ADN copia (ADNc) a partir del ARN obtenido de cada muestra. 2.5 μ L de ARN se agregó a 7.5 μ L de mezcla de RT, compuesta por: agua libre de nucleasas, buffer AMV 5X, MgSO₄, dNTPs 10mM, *Tfl* ADN polimerasa (Promega, EE.UU) 5units/ μ L, Transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) 10U (Promega, EE.UU) y primers 1-EV/RV y 2-EV/RV (Tabla 4) 10pmol/ μ L. Esta mezcla se incubó a 48 °C durante 45 minutos para generar el ADNc, seguido de 3 minutos a 94°C

para inactivar la enzima. Luego se incluyeron 45 ciclos de (94°C x 30 segundos, 55°C x 1.5 minutos y 72°C x 1 minutos), seguido de 72°C por 10 minutos. Posteriormente se colocó en hielo o 4°C.

A continuación a 1 µl de la mezcla se adicionó 5µL de buffer de reacción 10X, 16µl de agua libre de nucleasas, 0.5µL de dNTPs mix 10mM, 0.5µL de Taq DNA polymerase (Invitrogen, EE.UU) 5units/µL y primers 3-EV/RV y 4-EV/RV (Tabla 4) 10pmol/µL; obteniendo un volumen final de 24µL. Esta mezcla de reacción fue incubada 4 minutos a 95°C, 35 ciclos de (94°C x 30 segundos, 55°C x 1 minuto, 72°C x 30 segundos), seguido de 72°C por 10 minutos. Posteriormente se colocó en hielo o 4°C.

Finalmente, se realizó la detección de amplicones mediante electroforesis con gel de agarosa 2% y 0.5mg/mL de bromuro de etidio. El tamaño de nuestro producto de PCR fue de aproximadamente 220 nucleótidos.

Tabla 4. Primers utilizados para la identificación de EV (Coiras et al., 2004)

RT-PCR		Secuencia (5'→3')	Localización*	Tamaño del amplicon
1-EV/RV	Forward	CTCCGGCCCCCTGAATRYGGCTAA	445-467	EV (755 nt)
2-EV/RV	Reverse	TCIGGIARYTTCCASYACCAICC	1200-1178	RHV (639 nt)
Nested PCR				
3-EV/RV	Forward	ACCRASTACTTTGGGTRWCCGTG	536-559	EV (226 nt)
4-EV/RV	Reverse	CTGTGTTGAWACYTGAGCICCCA	762-743	RHV (110 nt)

*Con respecto al genoma de Poliovirus 1 cepa Sabin, 7500 nucleótidos

3.6.4 Amplificación de la región VP1

Para determinar los serotipos presentes en las muestras positivas para la región 5'UTR, sometimos los ARN obtenidos a una reacción RT-PCR semianidada (seminested RT-PCR), para la amplificación de la región que codifica VP1, utilizando los primers (Tabla 5) (Nix, Oberste, & Pallansch, 2006).

La síntesis de ADNc se llevó a cabo en 10 μ L de mezcla de reacción conteniendo: 5 μ L de ARN, 2.6 μ L de buffer de reacción 2X, 0.5 μ L de cada primer AN32, AN33, AN34, AN35 5pmol/ μ L, 0.2 μ L de RNasin y 0.2 μ L de Superscript III/Platinum Taq (Life Technology, EE.UU). Seguido de incubación a 22°C x 10 minutos, 45°C x 45 minutos, 95°C por 5 minutos, posteriormente se colocó en hielo o 4°C.

El volumen total (10 μ L) de la reacción anterior se utilizó para el primer PCR (PCR1) obteniendo un volumen final de 50 μ L. Al ADNc se le agregó: 10 μ L de buffer de reacción 5X, 4 μ L de dNTPs mix 2.5mM, 2.5 μ L de cada primer 222 y 224 10pmol/ μ L, 0.5 μ L de Go Taq DNA polymerase 2.5 U/ μ L (Promega, EE.UU) y 20.5 μ L de agua libre de nucleasas. Seguido de incubación a 95°C x 2 minutos y 38 ciclos de amplificación (95°C x 30 segundos, 42°C x 30 segundos, 60°C x 45 segundos), posteriormente se colocó en hielo o 4°C.

Como siguiente paso se realizó un segundo PCR (PCR2) para obtener una amplificación semianidada. 1 μ L de PCR1 se agregó a: 5 μ L de buffer de reacción 5X, 2 μ L de dNTPs mix 2.5mM, 1.25 μ L de cada primer AN88 y AN89 10pmol/ μ L, 0.25 μ L de Go Taq DNA polymerase 2.5 U/ μ L (Promega, EE.UU) y 14.25 μ L de agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de 25 μ L. Seguido de incubación a 95°C x 5 minutos y 38 ciclos de amplificación (95°C x 30 segundos, 60°C x 20 segundos, 72°C x 15 segundos), posteriormente se colocó en hielo o 4°C.

Finalmente, se realizó la detección de amplicones mediante electroforesis con gel de agarosa 2% y 0.5mg/mL de bromuro de etídio. El tamaño de nuestro producto de PCR fue entre 350 - 400 nucleótidos, ya que esta puede variar entre los distintos serotipos.

Tabla 5. Primers utilizados para la tipificación de EV (Nix et al., 2006)

Primer	Secuencia	Gen	Localización*
AN32	GTYTGCCA	VP1	3009-3002
AN33	GAYTGCCA	VP1	3009-3002
AN34	CCRTCRTA	VP1	3111-3104
AN35	RCTYTGCCA	VP1	3009-3002
222	CICCIIGGIGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951
224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	VP3	1977-1996
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	VP1	2977-2951
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	VP1	2602-2627

*Con respecto al genoma de Poliovirus 1 cepa Sabin

3.6.6 Secuenciamiento

Para el secuenciamiento, los fragmentos del gen VP1 se amplificaron y secuenciaron usando el kit de secuenciamiento Big Dye terminator cycle versión 3.1 (Applied Biosystems; EE.UU) en un secuenciador 3130XL DNA Sequencer (Applied Biosystems; EE.UU). Las secuencias obtenidas se analizaron usando el programa Sequencher 4.8 (Applied Biosystems; EE.UU) y BioEdit versión 7.0.0 (Isis Pharmaceuticals Inc.; EE.UU).

3.6.7 Análisis filogenéticos

Se utilizó el programa BLAST (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) para la identificación molecular de los serotipos de EV mediante comparación por pares (pairwise) de las secuencias del gen VP1 con una base de datos de todos los serotipos disponibles en GenBank. Las secuencias con al menos 75% de similaridad nucleotídica y una similaridad aminoacídica mayor al 85% del gen VP1 con su cepa representativa son consideradas dentro de un mismo serotipo (Oberste et al., 1999; Romero JR, 2007). El programa Clustal W (Max Vector Inc., EE.UU) se utilizó para el alineamiento múltiple de secuencias y el árbol filogenético fue inferido usando Kimura 2-parámetros y el algoritmo neighbor-joining con un bootstrap 1000 en el software MEGA 5.0.

3.6.8 Análisis estadístico

En el estudio epidemiológico, los datos obtenidos de los pacientes y cada uno de los aislamientos fueron introducidos en una base de datos, utilizando para ello el programa informático Microsoft Access. Se recogieron los siguientes datos del paciente: mes de obtención de muestra, edad, sexo, diagnóstico, serotipo y línea celular del aislamiento. El análisis descriptivo y comparativo (chi cuadrado) de los datos se realizó utilizando el programa SPSS 17 Software (SPSS, Chicago, EE.UU). En los análisis comparativos, un $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa con una probabilidad del 95%.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Datos epidemiológicos de la población estudiada

Durante enero a diciembre del 2011, se colectaron un total de 424 muestras de hisopado faríngeo de igual número de individuos. La mayor cantidad de muestras fueron de varones con un radio de 1.14:1. Se observó un rango de edad de 0 años a 14 años 10 meses (media 2 años 4 meses y mediana 1 año 1 mes), donde el 88% de las muestras correspondían a niños ≤ 5 años ($n=363$). Además, los meses de marzo a junio presentaron la mayor cantidad de muestras, coincidiendo con el inicio del año escolar.

4.1.2 Aislamiento de enterovirus

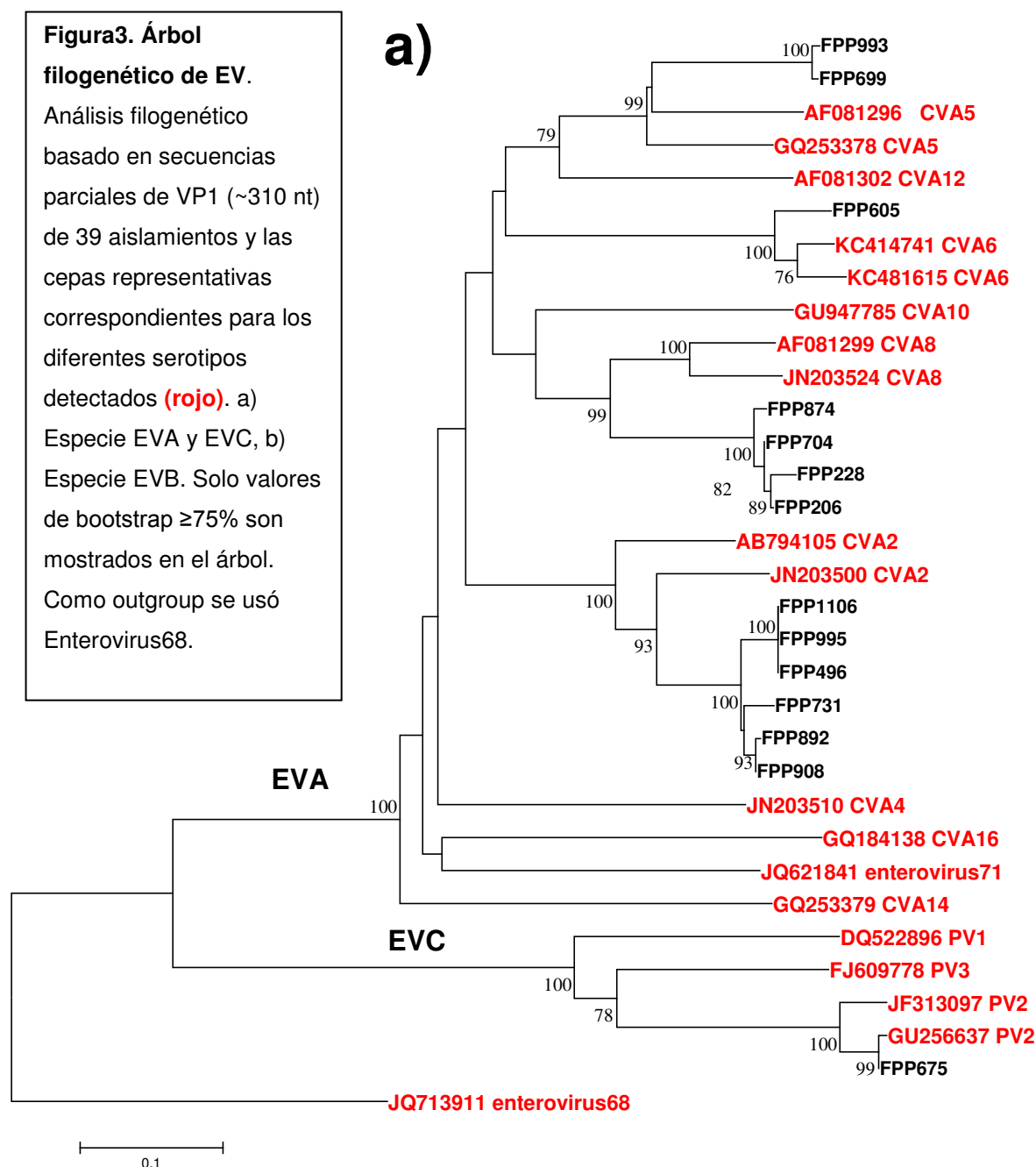
Del total de muestras analizadas, se logró aislar 47 EV. La mayor cantidad de aislamientos se presentaron en varones con un radio de 1.17:1. Se observó que el 87.2% ($n=41$) de EV aislados correspondían a niños ≤ 5 años con mediana y media de 1 año y 1 año 8 meses, respectivamente (Tabla 6). En todos los meses del año hubo al menos un aislamiento de EV, sin embargo, el mes de julio presentó la mayor frecuencia ($n=9$)

Además, 21 de los 47 aislamientos fueron correctamente tipificadas mediante inmunofluorescencia empleando los anticuerpos descritos anteriormente. Las 26 restantes se encontraban dentro de un grupo de 42 muestras seleccionadas para su análisis por RT-PCR, estas muestras presentaron los criterios descritos anteriormente en metodología.

4.1.3 Tipificación de enterovirus

Mediante el uso de inmunofluorescencia y biología molecular (RT-PCR), se logró determinar el serotipo de 40 aislamientos. Los 7 aislamientos restantes no pudieron ser tipificados correctamente pues presentaron un resultado positivo por RT-PCR para la región 5'UTR lo que confirma que pertenece a los EV, pero negativo para la región VP1 lo que no permitió su serotipificación. Estos aislamientos fueron nombrados como "enterovirus" (Tabla 6 y 7).

Los serotipos de los EV detectados se determinaron mediante un análisis filogenético de las secuencias del gen VP1 obtenidas después del secuenciamiento y secuencias de cepas representativas obtenidas de la base de datos GenBank. El porcentaje bootstrap y la identidad nucleotídica de las secuencias obtenidas con respecto a la cepa patrón fue mayor a 90% (Figura 3a y 3b).



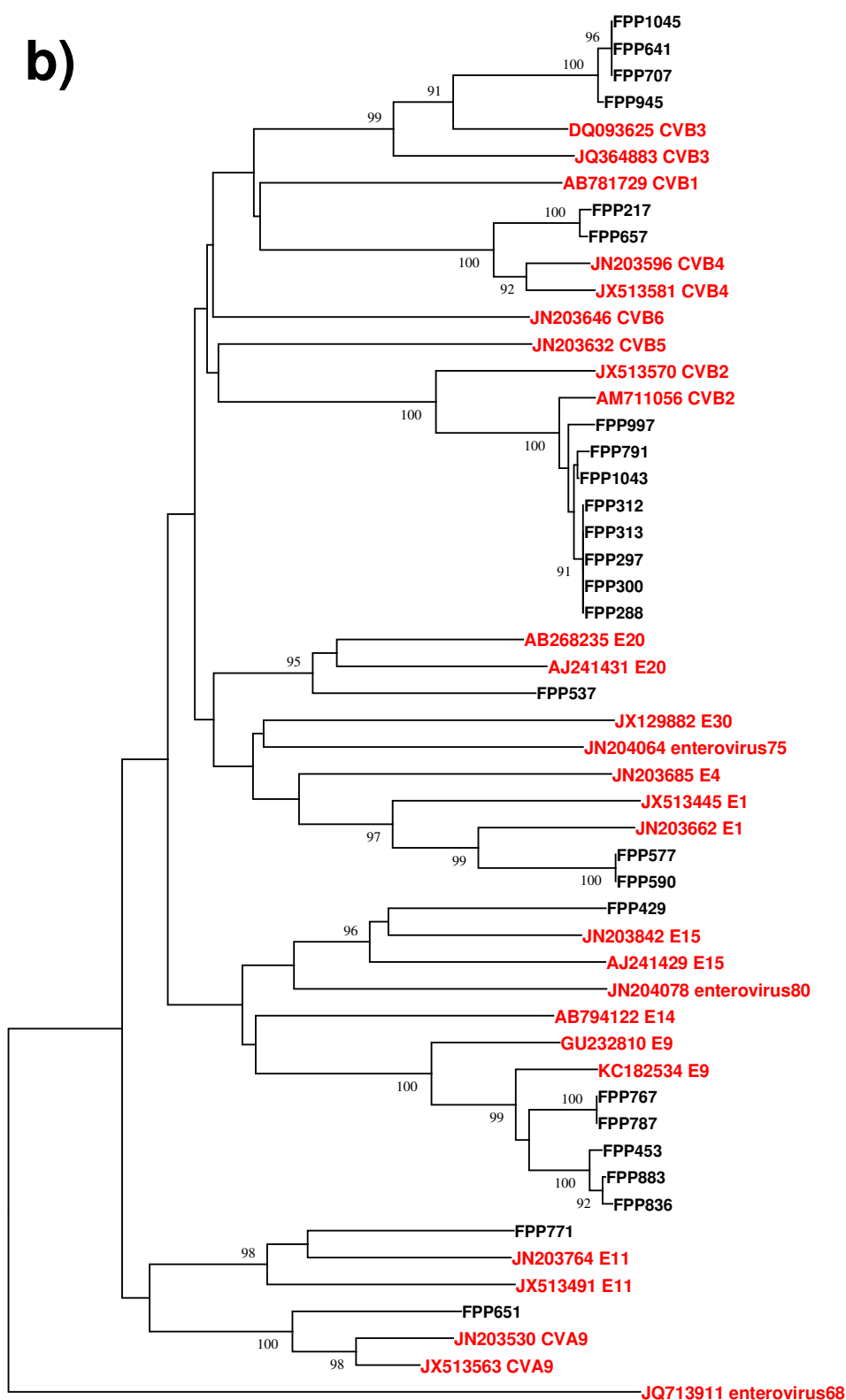


Figura 3. Árbol filogenético de EV. Análisis filogenético basado en secuencias parciales de VP1 (~310 nt) de 39 aislamientos y las cepas representativas correspondientes para los diferentes serotipos detectados (**rojo**). a) Especie EVA y EVC, b) Especie EVB. Solo valores de bootstrap $\geq 75\%$ son mostrados en el árbol. Como outgroup se usó Enterovirus68.

Se obtuvieron 15 serotipos, la especie EVB fue la más diversa con 9 serotipos, seguida de EVA con 4 serotipos y EVC con 2 serotipos. No se encontraron virus de la especie EVD. Los serotipos aislados con mayor frecuencia fueron CVB2, CVA2 y E9 (Tabla 6)

Tabla 6. Distribución de serotipos por especie y grupo de edad

ESPECIE	SEROTIPO	#	GRUPO DE EDAD			
			< 1 año	1 - 5 años	6-10 años	11-15 años
Enterovirus A	CVA2	6	1	5	-	-
	CVA5	2	-	2	-	-
	CVA6	1	1	-	-	-
	CVA8	4	2	1	1	-
Enterovirus B	CVA9	1	1	-	-	-
	CVB2	8	4	4	-	-
	CVB3	4	2	-	2	-
	CVB4	2	1	-	1	-
	E1	2	1	1	-	-
	E9	5	-	3	1	1
	E11	1	-	1	-	-
	E15	1	1	-	-	-
	E20	1	1	-	-	-
Enterovirus C	PV2	1	1	-	-	-
	PV3	1	1	-	-	-
Enterovirus		7	5	2	-	-
TOTAL		47	22	19	5	1

CVA: coxsackievirusA, CVB: coxsackievirusB, E: echovirus, PV: poliovirus

4.1.4 Prevalencia de enterovirus en Piura 2011

Al observar la prevalencia obtenida utilizando solo líneas celulares animales (LLCMK2 y Vero) versus las líneas celulares humanas (RD y A549), se observó que esta se incrementó más de 6 veces (1.65% [7/424] vs. 10.6% [45/424]). Sin embargo, utilizando en conjunto las 4 líneas celulares se obtuvo una prevalencia total de EV en pacientes con ETI del 11.1%.

4.1.5 Comparación de aislamiento en líneas celulares

La línea celular que presentó mayor porcentaje de aislamientos fue A549 (55.3%), seguida de RD (48.9%), LLCMK2 (14.9%) y Vero (8.5%). Comparando las dos líneas celulares con mayor cantidad de aislamientos, A549 y RD, se encontró diferencia significativa entre ambas ($p=0.001$). Además para fines de análisis se agruparon las líneas celulares LLCMK2 y Vero (células animales) y A549 y RD (células humanas), siendo mejores estadísticamente estas últimas ($p=0.0001$). En las células RD el efecto citopático para enterovirus se presentó entre 3 - 5 días (Figura 4 y Figura 5); mientras que para el caso de células A549 fue de 5 - 7 días (Figura 6 y Figura 7).

Por otro lado, se obtuvo una mayor diversidad de serotipos en células RD (9 serotipos), de los cuales 6 se aislaron únicamente en esta línea celular. Cabe resaltar que todos los serotipos de la especie EVA se aislaron exclusivamente en células RD (Tabla 7).

Tabla 7. Serotipos aislados por línea celular

SEROTIPO	#	LINEA CELULAR			
		LLCMK2	Vero	RD	A549
CVA2	6			6	
CVA5	2			2	
CVA6	1			1	
CVA8	4			4	
CVA9	1			1	
CVB2	8	1			8
CVB3	4	3	3		2
CVB4	2	1			1
E1	2				2
E9	5			4	4
E11	1			1	1
E15	1			1	
E20	1			1	1
PV2	1				1
PV3	1	1			
Enterovirus	7	1	1	3	8
TOTAL	47	7	4	24	28

CVA: coxsackievirus A, CVB: coxsackievirus B, E: echovirus, PV: poliovirus

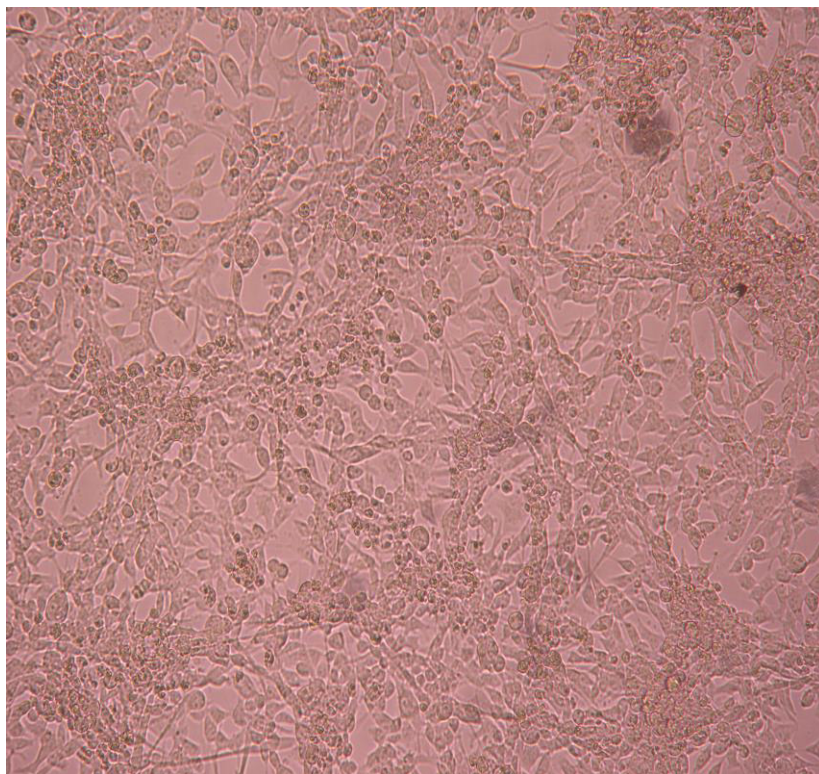


Figura 4: Monocapa de células RD sin infectar

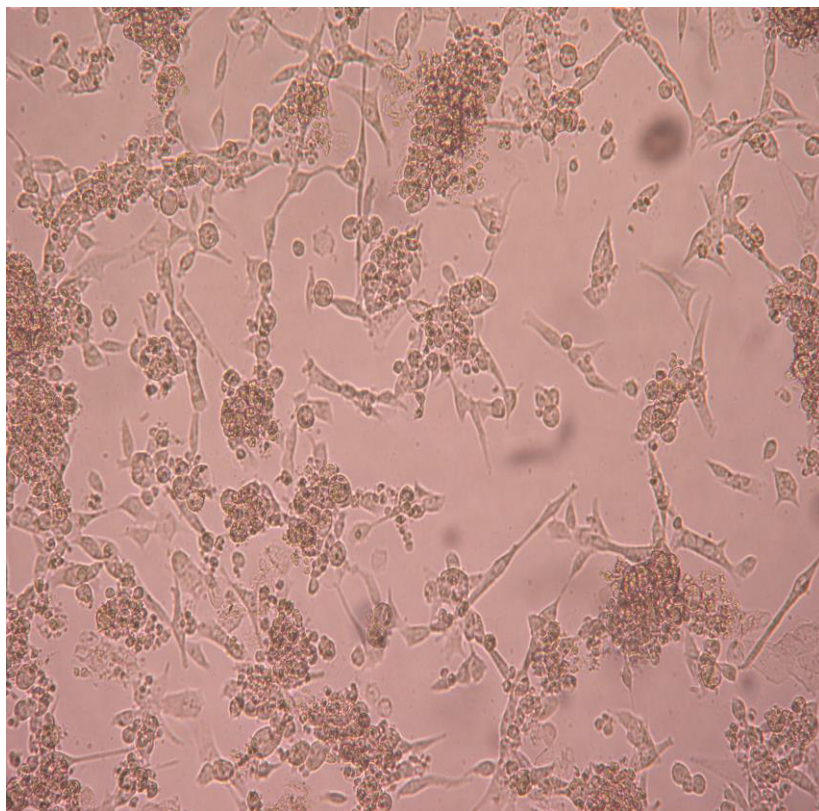


Figura 5: Células RD con efecto citopático por enterovirus

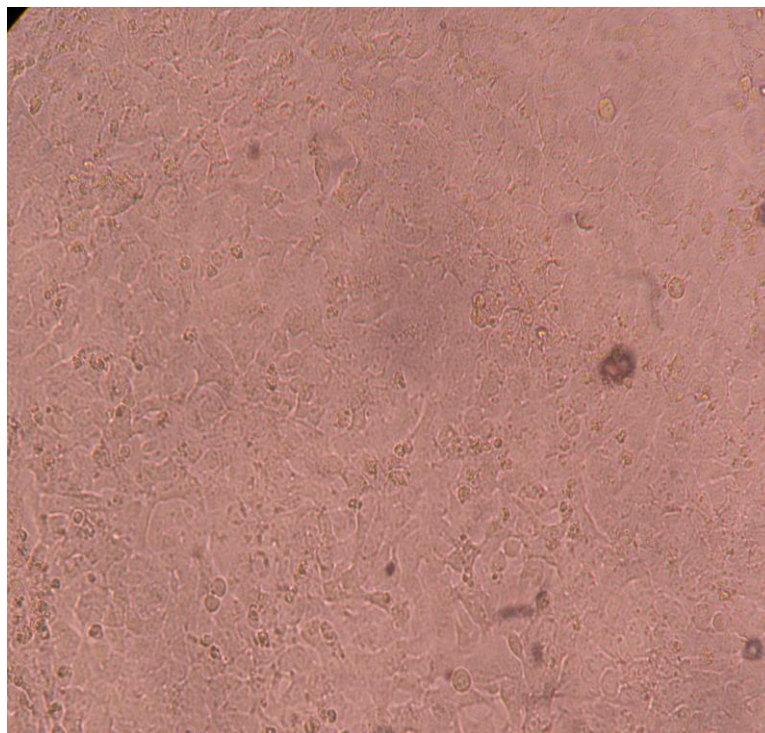


Figura 6: Monocapa de células A549 sin infectar

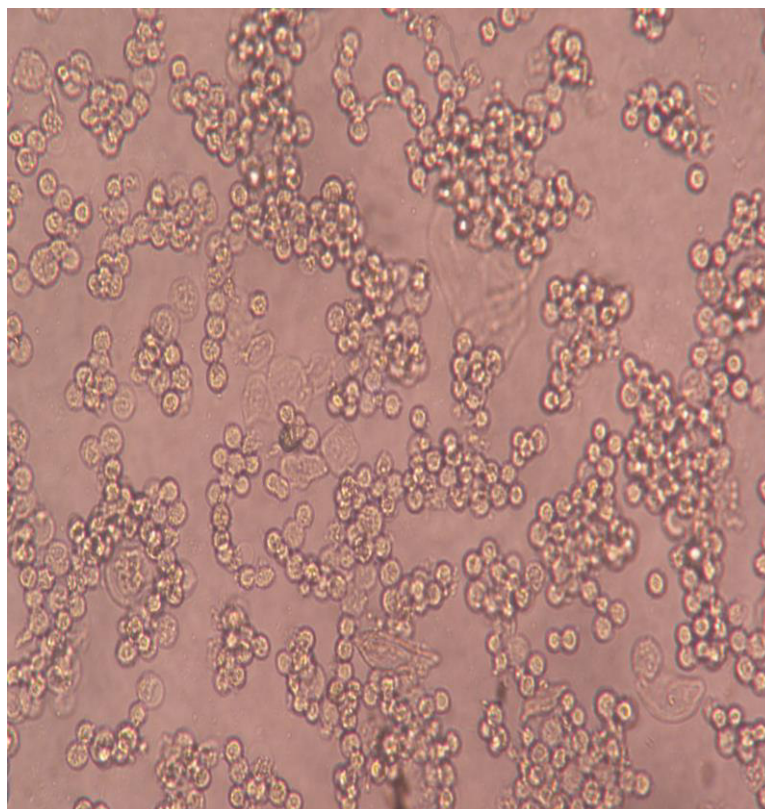


Figura 7: Células A549 con efecto citopático por enterovirus

4.2 Discusión

4.2.1 Enterovirus en Perú

El primer punto abordado en mi estudio fue el determinar la prevalencia de EV asociado a enfermedad tipo influenza en niños menores de 15 años en el distrito de Piura durante el año 2011. La prevalencia de EV relacionado a infecciones respiratorias descrita en investigaciones anteriores en Sudamérica se encuentra entre 0.5 - 2.1% (Arango et al., 2015; Douce et al., 2011; Huaman et al., 2014; Laguna-Torres et al., 2009; Laguna-Torres et al., 2010; Portes et al., 1998). Existen pocos estudios realizados en nuestro país; de estos antecedentes se pueden rescatar los resultados obtenidos en Piura durante junio 2006 y mayo 2008, 0.7% (Laguna-Torres et al., 2009) y durante enero 2005 y diciembre 2010, 1.2% (Huaman et al., 2014).

Cabe resaltar que la mayoría de investigaciones citadas como referencia emplean cultivo celular para el aislamiento de EV utilizando las líneas celulares LLCMK2 y Vero E6, empleadas también en mi estudio.

La prevalencia encontrada analizando solo los aislamientos obtenidos en células LLCMK2 y Vero E6 fue 1.6%, superior a la obtenida en investigaciones anteriores (Huaman et al., 2014; Laguna-Torres et al., 2009). El análisis de muestras de solo un año en mi estudio, se presentaría como una posible explicación para el aumento de la prevalencia puesto que los estudios citados anteriormente analizan muestras de un intervalo más amplio de tiempo. Sin embargo esta prevalencia sufre un incremento sustancial cuando se analiza en conjunto los aislamientos obtenidos con las 4 líneas utilizadas, resultando en una prevalencia total del 11.1%.

La infección por EV es un cuadro principalmente infantil, como se puede deducir de los grupos de edad analizados en este estudio. Estas infecciones se concentran en los primeros años de vida, con un 46.8% en menores de 1 año y 87.2% en menores de 5 años. Este es un hallazgo comentado repetidamente por otros autores que han observado que la mayor frecuencia de infección por EV se da en niños menores de 5 años de edad (Baek et al., 2011; Garcia et al., 2013; Huaman et al., 2014; Romero

JR, 2007; Tapparel, Siegrist, Petty, & Kaiser, 2013; Zhao, Jiang, Jiang, Chen, & Perlin, 2005), llegando a comunicar cifras en torno al 40% en menores de 1 año (CDC, 2002) y 91% en menores de 14 años (Druyts-Voets, 1997). Cuando se producen brotes epidémicos por EV no-polio en la población general, los neonatos se encuentran especialmente en riesgo. Los datos epidemiológicos por ello, presentan importancia para tratar de minimizar el riesgo de infecciones neonatales, siguiendo los consejos en cuanto a medidas preventivas frente a la infección enteroviral en el parto. Estas medidas inciden en la importancia de conocer un posible estado infeccioso de la madre, así como la ampliación de medidas higiénicas básicas por parte del personal sanitario (Magnius, Sterner, & Enocksson, 1990).

Al estudiar las especies de EV aislados destacan EVB con el 62.5%, seguido de EVA con el 32.5%. En el primer grupo destacan CVB2 y E9, mientras que en el segundo destacan CVA2 y CVA8. Esta distribución de especies difiere a las observadas en otros estudios realizados en Francia, Taiwán y Perú (Huaman et al., 2014; Jacques et al., 2008; Lo et al., 2010), en todos ellos la especie EVB presenta entre 89 y 94% de EV aislados. Esta diferencia podría radicar en el aumento de aislamientos de coxsackievirus A en mi estudio por el uso de células RD, puesto que este grupo de EV presenta mayor afinidad por esta línea celular (Romero JR, 2007).

El aislamiento de virus de la especie EVA en mi estudio, es de gran importancia puesto que esta especie está relacionada a infecciones del sistema nervioso central (Modlin J, 2010; Romero JR, 2007; Tapparel et al., 2013) y presenta un antecedente y referencia para próximos estudios con muestras de este tipo de infecciones. De todas formas, la realización del diagnóstico en cultivo celular (donde crecen mal o no lo hacen muchos agentes de esta especie) hace que los resultados obtenidos puedan diferir respecto a datos de otros países, donde se inoculaban ratones para cultivar EV. En este sentido, la aplicación de técnicas de biología molecular para el diagnóstico o el empleo de líneas celulares con mayor afinidad permitiría localizar infecciones asociadas a esos serotipos de difícil crecimiento en cultivo celular (Chambon et al., 2001).

Además de los 15 diferentes serotipos encontrados, observamos que 7 cepas no pudieron ser tipificadas con la metodología expuesta anteriormente. Este hecho podría deberse a la existencia de fenómenos de recombinación que pueden alterar el genoma viral (Lukashev et al., 2005) o la utilización de primers incapaces de unirse al genoma de todos los EV. Este puede ser un hecho importante, ya que la región utilizada para secuenciar y determinar el serotipo es una porción de VP1, que codifica una proteína expuesta al ambiente y que muestra cambios en su estructura con el paso del tiempo. Los cebadores que utilizamos están degenerados para unirse al máximo número de serotipos posibles, lo que puede perjudicar a la sensibilidad de la técnica, ya que se pueden amplificar productos inespecíficos que camuflen el producto viral. Para evitar esto, podríamos utilizar protocolos capaces de amplificar individualmente grupos de EV y/o primers con menos contenido de inosina (Oberste et al., 2006).

Otra posibilidad es que algunas de estas cepas correspondan a picornavirus con características clínicas y de crecimiento en cultivo celular similar a EV, como los parechovirus, que en la actualidad solo podrían ser caracterizados mediante técnicas de biología molecular (Nix, Maher, Pallansch, & Oberste, 2010). Estos agentes, podrían ser clasificados como EV, pero luego no podrían ser clasificados dentro de algún serotipo conocido. Algunos autores han reportado una alta frecuencia de estos virus, por ejemplo en Holanda un 12% de supuestos EV aislados por cultivo celular fueron posteriormente caracterizados como parechovirus (Benschop et al., 2006) y en Japón la seroprevalencia en niños es del 15% y a los 30 años llega al 80% (Ito, Yamashita, Tsuzuki, Takeda, & Sakae, 2004).

4.2.2 Comparación de líneas celulares

Para comparar la susceptibilidad de las líneas celulares utilizadas en nuestro estudio, se realizó aislamiento por cultivo celular de las 424 muestras incluidas. Los 47 enterovirus detectados crecieron en alguna de las líneas celulares luego de 10 días pos-inoculación.

Los resultados indican que RD y A549 son las líneas celulares más adecuadas para el cultivo de EV como han comentado algunos estudios realizados con estas y otras líneas celulares donde ambas mostraban una gran actividad (Mizuta et al., 2008; Romero JR, 2007; She et al., 2006; Terletskaia-Ladwig et al., 2008). La adición de las líneas celulares humanas RD y A549 incrementa 6.7 veces nuestra capacidad de detección de EV. Además el uso de estas dos líneas celulares permitió obtener una mayor diversidad de serotipos aumentando de 4 con las líneas celulares animales a 14 con RD y A549. Además, los 5 serotipos del grupo coxsackievirus A y echovirus 15 se replicaron únicamente en las células RD.

En la literatura encontramos datos referentes a la multiplicación de otros serotipos no incluidos en nuestros resultados. De esta manera, E3, E6, E7, E11, E13, E17, E18, E20, E30, CVB1 – B5, PV 1-3, CVA16 son capaces de infectar células A549 (Prim et al., 2013; She et al., 2006; Tsao et al., 2010) y RD es capaz de soportar, según diferentes estudios, el crecimiento de E3, E7, E12, E15-16, E19, E26-29, E31-32, CVA2, CVA4, CVA5-10, CVA12, CVA14, CVA16, CVA20-21, CVB3, PV1-2 (Mizuta et al., 2008; Mizuta, Abiko, Goto, Murata, & Murayama, 2003; Prim et al., 2013; Terletskaia-Ladwig et al., 2008; Tsao et al., 2010). Por consiguiente, podemos encontrar alternativas a las clásicas células primarias de riñón de mono o a los animales de experimentación.

Numerosos estudios han resaltado la importancia de combinar diferentes líneas celulares para permitir el crecimiento de los diferentes EV, algunos de estos estudios solían incluir líneas celulares, tales como PMK, BGM, Vero, RD, MRC-5, Hep-2 o A549 (Mizuta et al., 2003; Mizuta et al., 2008; Prim et al., 2013; She et al., 2006; Tsao et al., 2010). Luego de realizar el análisis se observó que incluir las líneas celulares RD y A549, permite el aislamiento de un mayor número de EV sobreestimados por el uso de las líneas celulares de riñón de mono LLCMK2 y Vero E6, estas últimas usadas rutinariamente en estudios de virus respiratorios en diferentes partes del mundo. De este modo, podemos obtener resultados más cercanos a la

realidad con respecto al rol de EV asociados a infecciones respiratorias en nuestro país.

La inmunofluorescencia se viene utilizando como principal herramienta para confirmar o descartar el crecimiento de EV en cultivo celular (Bastis, Simonet, Patterson, & Neill, 1995). Su utilización permite detectar muchos casos positivos en el cual el efecto citopático es nulo o escaso. Sin embargo, esta técnica depende de la complementariedad de los anticuerpos monoclonales utilizados con los viriones, está sujeta a la experticia del observador y requiere una cantidad adecuada en el medio para ser visualizada. La complementación con técnicas de biología molecular como se empleó en nuestro estudio optimiza la detección y subsiguiente caracterización de los EV presentes en las muestras analizadas.

CONCLUSIONES

1. Se encontró una prevalencia de 11.1% de infección por enterovirus en niños menores de 15 años en Piura, durante el año 2011.
2. Se detectaron 15 serotipos diferentes de enterovirus asociados a infección en mi estudio. Los serotipos CVA2, E1, E11, E15 y E20 son descritos primera vez en nuestro país.
3. La adición de células RD y A549 a las usadas rutinariamente en el diagnóstico de virus respiratorios permiten detectar en cultivo una mayor cantidad y diversidad de enterovirus.
4. La infección de enterovirus en casos de enfermedad tipo influenza se produce principalmente en pacientes menores de 1 año (45.8%).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arango, A. E.**, Jaramillo, S., Perez, J., Ampuero, J. S., Espinal, D., Donado, J., . . . Laguna-Torres, A. (2015). Influenza-like illness sentinel surveillance in one hospital in Medellin, Colombia. 2007-2012. *Influenza Other Respir Viruses*, 9(1), 1-13.
- Baek, K.**, Yeo, S., Lee, B., Park, K., Song, J., Yu, J., . . . Park, J. (2011). Epidemics of enterovirus infection in Chungnam Korea, 2008 and 2009. *Virology*, 8, 297.
- Bastis, D.**, Simonet, S., Patterson, M. A., & Neill, S. (1995). Identification of enteroviruses by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *Clin Diagn Virol*, 3(1), 83-93.
- Benschop, K. S.**, Schinkel, J., Minnaar, R. P., Pajkrt, D., Spanjerberg, L., Kraakman, H. C., . . . Wolthers, K. C. (2006). Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis*, 42(2), 204-210.
- Buck, G. E.**, Wieseemann, M., & Stewart, L. (2002). Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (Super E-Mix) with RT-PCR and conventional cell culture for the diagnosis of enterovirus meningitis. *J Clin Virol*, 25 Suppl 1, S13-18.
- Casas, I.**, Palacios, G. F., Trallero, G., Cisterna, D., Freire, M. C., & Tenorio, A. (2001). Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol*, 65(1), 138-148.
- Castro, C. M.**, Cruz, A. C., Silva, E. E., & Gomes Mde, L. (2005). Molecular and seroepidemiologic studies of Enterovirus 71 infection in the State of Para, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 47(2), 65-71.
- CDC.** (2002). Enterovirus Surveillance-United States, 2000-2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 51(46), 1047-1049.
- Chambon, M.**, Archimbaud, C., Bailly, J. L., Henquell, C., Regagnon, C., Charbonne, F., & Peigue-Lafeuille, H. (2001). Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. *J Med Virol*, 65(2), 340-347.

- Cisterna, D. M.**, Palacios, G., Rivero, K., Girard, D., Lema, C., & Freire, M. C. (2007). Epidemiology of enterovirus associated with neurologic diseases. *Medicina (B Aires)*, 67(2), 113-119.
- Coiras, M. T.**, Aguilar, J. C., Garcia, M. L., Casas, I., & Perez-Brena, P. (2004). Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol*, 72(3), 484-495.
- Douce, R. W.**, Aleman, W., Chicaiza-Ayala, W., Madrid, C., Sovero, M., Delgado, F., . . . Laguna-Torres, V. A. (2011). Sentinel surveillance of influenza-like-illness in two cities of the tropical country of Ecuador: 2006-2010. *PLoS One*, 6(8), e22206.
- Druyts-Voets, E.** (1997). Epidemiological features of entero non-poliovirus isolations in Belgium 1980-94. *Epidemiol Infect*, 119(1), 71-77.
- Freire, M. C.**, Cisterna, D. M., Rivero, K., Palacios, G. F., Casas, I., Tenorio, A., & Gomez, J. A. (2003). Analysis of an outbreak of viral meningitis in the province of Tucuman, Argentina. *Rev Panam Salud Publica*, 13(4), 246-251.
- Garcia, J.**, Espejo, V., Nelson, M., Sovero, M., Villaran, M. V., Gomez, J., . . . Halsey, E. S. (2013). Human rhinoviruses and enteroviruses in influenza-like illness in Latin America. *Virology*, 10, 305.
- Gomes Mde, L.**, de Castro, C. M., Oliveira, M. J., & da Silva, E. E. (2002). Neutralizing antibodies to enterovirus 71 in Belem, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(1), 47-49.
- Hierholzer, J. C.**, Castells, E., Banks, G. G., Bryan, J. A., & McEwen, C. T. (1993). Sensitivity of NCI-H292 human lung mucoepidermoid cells for respiratory and other human viruses. *J Clin Microbiol*, 31(6), 1504-1510.
- Huaman, J. L.**, Carrion, G., Ampuero, J. S., Gomez, J., Ocana, V., Paz, I., . . . Halsey, E. S. (2014). Non-rhinovirus enteroviruses associated with respiratory infections in Peru (2005-2010). *Virology*, 11, 169.
- Ito, M.**, Yamashita, T., Tsuzuki, H., Takeda, N., & Sakae, K. (2004). Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol*, 85(Pt 2), 391-398.

- Jacques, J.**, Moret, H., Minette, D., Leveque, N., Jovenin, N., Deslee, G., . . . Andreoletti, L. (2008). Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol*, 46(1), 206-213.
- Kluge, M.**, Fleck, J. D., Soliman, M. C., Luz, R. B., Fabres, R. B., Comerlato, J., . . . Spilki, F. R. (2014). Human adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil. *J Water Health*, 12(3), 526-532.
- Knowles N.J.**, Hovi T, Hyypiä T, King A.M.Q, Lindberg A.M, Pallansch M.A, . . . R, Z. (2012). Picornaviridae. In King A.M.Q, Adams M.J, Carstens E.B & L. E.J (Eds.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 855-880). San Diego: Elsevier.
- Koon, K.**, Sanders, C. M., Green, J., Malone, L., White, H., Zayas, D., . . . Han, J. (2010). Co-detection of pandemic (H1N1) 2009 virus and other respiratory pathogens. *Emerg Infect Dis*, 16(12), 1976-1978.
- Laguna-Torres, V. A.**, Gomez, J., Ocana, V., Aguilar, P., Saldarriaga, T., Chavez, E., . . . Kochel, T. (2009). Influenza-like illness sentinel surveillance in Peru. *PLoS One*, 4(7), e6118.
- Laguna-Torres, V. A.**, Gomez, J., Aguilar, P. V., Ampuero, J. S., Munayco, C., Ocana, V., . . . Kochel, T. J. (2010). Changes in the viral distribution pattern after the appearance of the novel influenza A H1N1 (pH1N1) virus in influenza-like illness patients in Peru. *PLoS One*, 5(7), e11719.
- Lo, C. W.**, Wu, K. G., Lin, M. C., Chen, C. J., Ho, D. M., Tang, R. B., & Chan, Y. J. (2010). Application of a molecular method for the classification of human enteroviruses and its correlation with clinical manifestations. *J Microbiol Immunol Infect*, 43(5), 354-359.
- Lukashev, A. N.**, Lashkevich, V. A., Ivanova, O. E., Koroleva, G. A., Hinkkanen, A. E., & Ilonen, J. (2005). Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J Gen Virol*, 86(Pt 12), 3281-3290.

- Magnius, L.**, Sterner, G., & Enocksson, E. (1990). Infections with echoviruses and coxsackieviruses in late pregnancy. *Scand J Infect Dis Suppl*, 71, 53-57.
- Melnick, J. L.**, Rennick, V., Hampil, B., Schmidt, N. J., & Ho, H. H. (1973). Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull World Health Organ*, 48(3), 263-268.
- Minor PD**, & Muir P. (2009). Enteroviruses. In Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD & Mortimer P (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Virology* (Sixth ed., pp. 601–624). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Mistchenko, A. S.**, Viegas, M., Latta, M. P., & Barrero, P. R. (2006). Molecular and epidemiologic analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children. *J Clin Virol*, 37(4), 293-299.
- Mizuta, K.**, Abiko, C., Goto, H., Murata, T., & Murayama, S. (2003). Enterovirus isolation from children with acute respiratory infections and presumptive identification by a modified microplate method. *Int J Infect Dis*, 7(2), 138-142.
- Mizuta, K.**, Abiko, C., Aoki, Y., Suto, A., Hoshina, H., Itagaki, T., . . . Ootani, K. (2008). Analysis of monthly isolation of respiratory viruses from children by cell culture using a microplate method: a two-year study from 2004 to 2005 in yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis*, 61(3), 196-201.
- Modlin J.** (2010). Introduction to the Enteroviruses and Parechoviruses. In Mandell G, Bennet J & Dolin R (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Seventh ed., pp. 2337). Philadelphia: Elsevier.
- Monto, A. S.** (2002). Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med*, 112 Suppl 6A, 4S-12S.
- Nix, W. A.**, Maher, K., Pallansch, M. A., & Oberste, M. S. (2010). Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing. *J Clin Virol*, 48(3), 202-207.
- Nix, W. A.**, Oberste, M. S., & Pallansch, M. A. (2006). Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all

enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 44(8), 2698-2704.

Oberste, M. S., Maher, K., & Pallansch, M. A. (1998). Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. *Virus Res*, 58(1-2), 35-43.

Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., Flemister, M. R., Brown, B. A., & Pallansch, M. A. (1999). Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*, 37(5), 1288-1293.

Oberste, M. S., Maher, K., Williams, A. J., Dybdahl-Sissoko, N., Brown, B. A., Gookin, M. S., . . . Pallansch, M. A. (2006). Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*, 87(Pt 1), 119-128.

Portes, S. A., Da Silva, E. E., Siqueira, M. M., De Filippis, A. M., Krawczuk, M. M., & Nascimento, J. P. (1998). Enteroviruses isolated from patients with acute respiratory infections during seven years in Rio de Janeiro (1985-1991). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 40(6), 337-342.

Prim, N., Rodriguez, G., Margall, N., Del Cuerpo, M., Trallero, G., & Rabella, N. (2013). Combining cell lines to optimize isolation of human enterovirus from clinical specimens: report of 25 years of experience. *J Med Virol*, 85(1), 116-120.

Racaniello, V. R. (2007). Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields in Virology* (5th ed., Vol. 1, pp. 796-831). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

Romero JR. (2007). Enteroviruses and Parechoviruses. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen MA, Pfaller MA & Landry ML (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (pp. 1392–1404). Washington D.C: ASM press.

She, R. C., Crist, G., Billetdeaux, E., Langer, J., & Petti, C. A. (2006). Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: a national perspective. *J Clin Virol*, 37(3), 151-155.

Spilki, F. R., da Luz, R. B., Fabres, R. B., Soliman, M. C., Kluge, M., Fleck, J. D., . . . Roehe, P. M. (2013). Detection of human adenovirus, rotavirus and enterovirus in water samples collected on dairy farms

from Tenente Portela, Northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Microbiol*, 44(3), 953-957.

Straliotto, S. M., Siqueira, M. M., Muller, R. L., Fischer, G. B., Cunha, M. L., & Nestor, S. M. (2002). Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 35(4), 283-291.

Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T. J., & Kaiser, L. (2013). Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol*, 14, 282-293.

Terletskaia-Ladwig, E., Meier, S., Hahn, R., Leinmuller, M., Schneider, F., & Enders, M. (2008). A convenient rapid culture assay for the detection of enteroviruses in clinical samples: comparison with conventional cell culture and RT-PCR. *J Med Microbiol*, 57(Pt 8), 1000-1006.

Trallero, G., Avellon, A., Otero, A., De Miguel, T., Perez, C., Rabella, N., . . . Cabrerizo, M. (2010). Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies. *J Clin Virol*, 47(2), 170-176.

Tsao, K. C., Huang, C. G., Huang, Y. L., Chen, F. C., Huang, P. N., Huang, Y. C., . . . Chang, S. C. (2010). Epidemiologic features and virus isolation of enteroviruses in Northern Taiwan during 2000-2008. *J Virol Methods*, 165(2), 330-332.

Vecchia, A. D., Fleck, J. D., Comerlato, J., Kluge, M., Bergamaschi, B., Da Silva, J. V., . . . Spilki, F. R. (2012). First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Diluvio, Porto Alegre, Brazil. *Braz J Biol*, 72(2), 323-329.

Xiang, Z., Gonzalez, R., Wang, Z., Ren, L., Xiao, Y., Li, J., . . . Wang, J. (2012). Coxsackievirus A21, enterovirus 68, and acute respiratory tract infection, China. *Emerg Infect Dis*, 18(5), 821-824.

Zhao, Y. N., Jiang, Q. W., Jiang, R. J., Chen, L., & Perlin, D. S. (2005). Echovirus 30, Jiangsu Province, China. *Emerg Infect Dis*, 11(4), 562-567.